



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

# **DETEÇÃO DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS POR TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**ENEIDA MELLANY MASCARENHAS VARELA**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**JANEIRO 2018**



DESDE 1902  
INSTITUTO DE HIGIENE E  
MEDICINA TROPICAL  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE  
**NOVA**  
DE LISBOA

# **Deteção de Bactérias Anaeróbias em Amostras Biológicas por Técnicas de Biologia Molecular**

**Eneida Mellany Mascarenhas Varela**

Dissertação para obtenção do  
Grau de Mestre em Microbiologia Médica

Orientador: Doutor Paulo Paixão, Faculdade de Ciências Médicas.

Co-orientador: Doutora Maria de Jesus Chasqueira, Faculdade de Ciências Médicas.

**Nova Medical School/Faculdade de Ciências Médicas – Unidade de Infecção:  
Etiologia, patogénese e bases terapêuticas da NMS/FCM**

**Janeiro 2018**

## **i. Agradecimentos**

Antes de tudo agradeço a Deus, o todo poderoso pela vida que me deu, por estar sempre presente em todos os instantes e pelas oportunidades que não me faltaram durante todo o meu percurso enquanto estudante.

Agradeço também o Professor Doutor Paulo Paixão e a Doutora Maria de Jesus Chasqueira que, incansavelmente, se disponibilizaram para serem orientador e co-orientadora, respetivamente. Aproveito para agradecer por toda a orientação durante este percurso e por todas as sugestões e críticas, que foram cruciais para a elaboração deste trabalho.

Gostaria de agradecer ainda, a Dr. Augusta Marques e a Dr. Lúcia Rodrigues, pessoas que também foram cruciais para que este trabalho se desenvolvesse com normalidade. Agradeço-vos ainda pelo tempo que disponibilizaram, pela partilha de experiência, pelas opiniões e conselhos que foram sempre de mais valia em todas as etapas deste trabalho. Agradeço ainda a Doutora Elsa Gonçalves e a toda equipa do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental por terem fornecido todas as amostras, dados e informações que serviram de suporte para a realização deste trabalho.

Também não poderia deixar de agradecer ao meu querido e estimado marido Elves Heleno Duarte que, sempre me incentivou e encorajou ao longo de todo esse percurso, apoiando-me em tudo o que foi preciso e em todas as circunstâncias. Aproveito ainda para agradecer ao Doutor Luís Teixeira, Instituto Gulbenkian de Ciência, por ter facilitado e colaborado para que fosse possível sequenciar amostras naquele instituto.

Aproveito ainda para agradecer a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho e principalmente aos colegas Sérgio e Diana que, além de termos partilhado o laboratório e desafios, também contribuíram positivamente com ajudas e conselhos. Por fim e não o menos importante, gostaria de deixar um especial agradecimento aos meus queridos irmãos por todo o incentivo, e aos meus pais, Dulce e Armando, “princípios ativos” da minha existência e que sem eles, nada disso teria acontecido.

A todos, um muito obrigado.

## ii. Resumo

As bactérias anaeróbias constituem um importante componente da microflora humana e em algumas situações são responsáveis por um número significativo de infeções, por vezes com mortalidade associada. A sua correta identificação é fundamental para o sucesso do tratamento. A cultura é o método de diagnóstico de referência, mas apresenta algumas limitações, é demorada, laboriosa e com uma sensibilidade relativamente baixa. Técnicas moleculares, nomeadamente a PCR, têm sido utilizadas como auxílio na identificação de bactérias anaeróbias em amostras clínicas dada à sua alta sensibilidade, especificidade, rapidez na obtenção de resposta e a possibilidade de utilização de amostras cuja viabilidade dos microrganismos foi comprometida. Face ao exposto anteriormente considerou-se pertinente a realização do presente estudo que teve como principal objetivo estabelecer e otimizar protocolos de PCRtr que permitam a rápida e correta identificação, em amostras clínicas, dos principais géneros de bactérias anaeróbios clinicamente significativos, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium*, e comparar os resultados obtidos com os da cultura. Foram analisadas 158 amostras, das quais 49 foram positivas por PCRtr e apenas 31 foram positivas por cultura. Com a metodologia implementada foi possível identificar *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium*. Verificamos que o tratamento não afetou a identificação das bactérias anaeróbias por cultura, nem por PCRtr. A sensibilidade do PCRtr foi de 82% para o *Bacteroides* e 75% para a *Prevotella* e *Clostridium*, a especificidade foi de 87% para *Bacteroides* e *Prevotella*, e de 100% para o *Clostridium*. Em suma, concluímos que o protocolo otimizado utilizado neste estudo permitiu identificar as espécies de anaeróbios mais importantes, do ponto de vista clínico, podendo assim, ser usado como auxiliar da cultura no diagnóstico das infeções causadas por anaeróbios.

### iii. Abstract

Anaerobic bacteria are members of our bacterial community. Nevertheless, they can still cause a significant number of infection or mortality if not treated. The correct identification is critical to successfully implement the treatment. Culture is the gold standard technique. However, it is time-consuming, laborious and relatively low-sensitivity method. Molecular techniques, such as PCRs, have been widely used support in the identification of anaerobic bacteria in clinical specimens due to their high sensitivity and specificity, rapidity and the possibility of using samples whose viability has been compromised. Because of this, we aimed, in this study, to establish qPCR protocols that allow a rapid and correct identification in clinical samples of the major genera of clinically significant anaerobic bacteria (*Bacteroides*, *Prevotella*, and *Clostridium*) and to compare the results obtained with those of culture. We analysed 158 samples, of which 49 were classified as positive by qPCR and only 31 were given as positive per culture. The qPCR allowed us to identify *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Clostridium*, the three most important genera of anaerobes from the clinical point of view. We also found that the treatment did not affect the presence of anaerobic bacteria identified neither by culture nor by qPCR. The sensitivity of the qPCR for *Bacteroides* was of 82%, and of 75% for the identification of *Prevotella* and *Clostridium*, respectively. The specificity was 87% for the qPCR to identify *Bacteroides* and *Prevotella*, respectively and 100% for the qPCR to identify *Clostridium*. In summary, we concluded that our protocol allowed the identification of clinically important anaerobic species that can be used, under our conditions, to support the culture technique in the diagnosis of infections caused by anaerobes.

#### **iv. Palavras-chave**

Bactérias, anaeróbias, diagnóstico, cultura, PCRtr

## **v. Índice**

i. Agradecimentos .....	iii
ii. Resumo .....	iv
iii. Abstract.....	v
iv. Palavras-chave .....	vi
v. Índice .....	vii
vi. Índice de figuras .....	ix
vii. Índice de tabelas .....	x
viii. Lista de abreviaturas, siglas e símbolos .....	xii
1. Introdução .....	1
1.1. Bactérias anaeróbias: características gerais .....	1
1.2. Perspetivas históricas .....	4
1.3. Taxonomia .....	5
1.4. Epidemiologia das infeções bacterianas .....	10
1.5. Diagnóstico laboratorial.....	18
1.6. Tratamento de infeções causadas por bactérias anaeróbias .....	31
1.7. Objetivos .....	34
2. Material e Métodos .....	35
2.1. Amostras - recolha, transporte e armazenamento .....	35
2.2. Processamento das amostras .....	35
2.3. Protocolo de PCR em tempo real.....	41
2.4. Análises estatísticas .....	46
3. Resultados .....	48
3.1 Caracterização das amostras .....	48
3.2. Otimização de protocolo de extração.....	49
3.3. Identificação de bactérias aeróbias por cultura.....	51

3.4. Identificação de bactérias anaeróbias por cultura .....	52
3.5. Identificação de bactérias anaeróbias por PCRtr .....	53
3.6. Comparação de técnicas de identificação de bactérias anaeróbias .....	57
3.7. Sensibilidade e especificidade da técnica de PCRtr na identificação de bactérias anaeróbias .....	61
4. Discussão e conclusões .....	63
5. Referências Bibliográficas .....	71
6. Anexos .....	79



## vi. Índice de figuras

Figura 1. Identificação de bactérias anaeróbias através da capacidade de crescerem em tubos de ensaio contendo tioglicolato de sódio..	2
Figura 2 - Posição taxonómica dos três principais grupos de bactérias anaeróbias desde reino até o género.....	7
Figura 3 - Recolha de amostras por punção aspirativa para o diagnóstico de bactérias anaeróbias por cultura. ....	19
Figura 4 - Material de colheita, transporte e incubação de amostras biológicas em anaerobioses.....	23
Figura 5 - Principais passos para a análise do rRNA 16S na identificação de bactérias em amostras clínicas..	28
Figura 6 A reação ocorre num termociclador e cada ciclo é constituído por 3 etapas..	29
Figura 7 - PCRtr utilizando sonda TaqMan.....	31
Figura 8 - Esquema das diluições em série realizadas para estudar a sensibilidade analítica dos <i>primers</i> e sondas utilizados neste estudo..	45
Figura 9 – Reclassificação das amostras consoante as suas consistências. ....	49
Figura 10 - Presença de bactérias aeróbias identificadas por cultura no LMBM/HEM - CHLO.....	52
Figura 11 - Número de espécies de bactérias anaeróbias identificadas por cultura no LMBM/HEM -CHLO.....	54
Figura 12 - Otimização de condições para a deteção de <i>Clostridium</i> em amostras clínicas por PCRtr.....	55
Figura 13 - Deteção de bactérias anaeróbias em amostras clínicas por PCRtr.....	57

## vii. Índice de tabelas

Tabela 1 - Incidência de bacteremia anaeróbia analisadas a partir de hemocultura realizadas em vários estudos de diferentes países e anos.....	11
Tabela 2 - Local habitual de anaeróbios oportunistas.....	14
Tabela 3 - Espécies de grupo <i>B. fragilis</i> mais frequentemente isoladas em amostras clínicas e os locais de infecção. ....	15
Tabela 4 - Espécies de <i>Prevotella</i> mais frequentemente isoladas em amostras clínicas e os principais locais de infecção. ....	16
Tabela 5 – Algumas espécies clinicamente relevantes do <i>Clostridium cluster</i> I e as doenças associadas.....	17
Tabela 6 - Procedimentos de colheita de amostra para cultura anaeróbia.. ....	18
Tabela 7 - Sequências de <i>primers</i> e sondas utilizadas para identificação dos géneros <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> e <i>Clostridium</i> .....	41
Tabela 8 - Condições da reação de PCR convencional, usando o equipamento <i>T Gradient</i> , <i>Biometra</i> ®.....	43
Tabela 9 - Espécies bacterianas utilizadas no estudo da especificidade analítica dos <i>primers</i> e sondas. ....	46
Tabela 10 – Distribuição das amostras recolhidas no período de Outubro de 2016 a Maio de 2017 nos três hospitais do CHLO segundo a sua consistência e volume.....	48
Tabela 11 - Optimização do protocolo de extração de DNA a partir de líquidos biológicos utilizando protocolos para a lise destinados às bactérias de Gram positivo e para a lise de bactérias de Gram negativo.....	50
Tabela 12 - Optimização do protocolo de extração de DNA a partir de amostras purulentas utilizando dois kits de extração (QIAamp® DNA Stool Mini Kit- $\alpha$ e QIAamp® DNA Mini Kit- $\beta$ ).....	50
Tabela 13 - – Sensibilidade analítica dos <i>primers</i> e sondas para a deteção dos três géneros de bactérias anaeróbias, alvos desse estudo, <i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> e <i>Clostridium</i> . ....	56
Tabela 14 - Análise comparativa dos resultados obtidos por técnicas de identificação de bactérias anaeróbias (cultura e PCRtr).....	59
Tabela 15 - Análise comparativa dos resultados obtidos das técnicas de diagnóstico de <i>Clostridium</i> . ....	60

Tabela 16 - Sensibilidade e especificidade da técnica de identificação de bactérias anaeróbias por PCRtr quando comparada com a identificação por cultura (referência)..	61
--	----

## viii. Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

$NO_3^-$  – nitrato

$SO_4^{2-}$  – sulfato

°C – Graus Celsius

μL – Microlitro

μM – Micromolar

ATP – trifosfato de adenosina

BHQ – *Black hole quencher*

BLAST – *Basic local alignment search toll*

CHLO – Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental

Ct – do inglês *cycle threshold*

DNA - ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

dsDNA – DNA de cadeia dupla, do inglês *double-strand DNA*

FAM – 6-Carboxifluoresceína

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

$Fe^{3+}$  –ferro férrico

fg/μL – fentograma por microlitro

g - Grama

GC - Guanina e citosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogénio

HEM – Hospital Egas Moniz

HSC – Hospital de Santa Cruz

HSFX – Hospital São Francisco Xavier

LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

LMNMS – Laboratório de Microbiologia da NOVA Medical School

mg/mL – miligrama por mililitro

mL – mililitro

NADH – nicotinamide adenine dinucleotide

ng/ μL – nanogramas por microlitro

nM – nanomolar

O<sub>2</sub><sup>-</sup> - superóxido

pb – pares de bases

PCR - reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês *polymerase chain reaction*

PCRtr – PCR em tempo real

pg/μL – picograma por microlitro

pH – potencial de hidrogénio

rRNA – ácido ribonucleico ribossomal, do inglês *ribosomal ribonucleic acid*

TSA – Teste de sensibilidade aos antibióticos

UG – Unidade genómica

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

## 1. Introdução

### 1.1. Bactérias anaeróbias: características gerais

Bactérias anaeróbias são organismos capazes de crescer e produzir energia na ausência do oxigénio livre através de processos de oxidação-redução (Morris, 1975). Uma outra particularidade destas bactérias é a sua capacidade de resistir a condições ambientais adversas tais como a temperatura, pH e salinidade (Nozhevnikova *et al.*, 1999; Mesbah & Wiegel, 2008; Mayer & Müller, 2014). As bactérias anaeróbias diferem na sua capacidade de sobreviver na presença de oxigénio e podem ser divididas em anaeróbias obrigatórias, anaeróbias facultativas, anaeróbias microaerófilas e anaeróbias aerotolerantes (Figura 1). O crescimento diferencial das bactérias pode ser determinado usando um meio de enriquecimento contendo tioglicolato sódico, composto que consome oxigénio permitindo assim o crescimento de bactérias anaeróbias. Quando colocadas neste meio, as bactérias aeróbias (cujo crescimento depende do oxigénio), crescem unicamente na parte superior do tubo, onde a concentração de oxigénio é maior (Figura 1a) e as bactérias anaeróbias, no fundo do tubo, onde a concentração de oxigénio é menor (Figura 1b). As bactérias anaeróbias facultativas não precisam de oxigénio para o crescimento mas crescem melhor na sua presença (Prescott *et al.*, 2004). Assim, no tubo de tioglicolato estas crescem em toda a sua superfície sobretudo na primeira metade (Figura 1c), porque a respiração aeróbia é mais eficiente que os processos de oxidação-redução no que se refere à produção de ATP (Morris, 1975; Prescott *et al.*, 2004). As anaeróbias microaerófilas são bactérias que precisam de oxigénio para o crescimento, mas são sensíveis ao oxigénio atmosférico (20%). Estas desenvolvem-se melhor a concentrações de oxigénio entre 2 e 10%, pelo que no tubo de tioglicolato, são encontradas na primeira metade do tubo, nunca no limite superior (Figura 1d). O último grupo de bactérias anaeróbias são as aerotolerantes, contrariamente às anteriores, estas não precisam do oxigénio, mas também não são sensíveis a concentrações de 20%. No tubo de tioglicolato observa-se crescimento em toda a sua extensão (Figura 1e).

A incapacidade das bactérias anaeróbias de crescer na presença de oxigénio deve-se à ausência de produção da superóxido dismutase e da catalase, enzimas responsáveis por

inibir a toxicidade do superóxido ( $O_2^-$ ) e do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) (Prescott *et al.*, 2004).

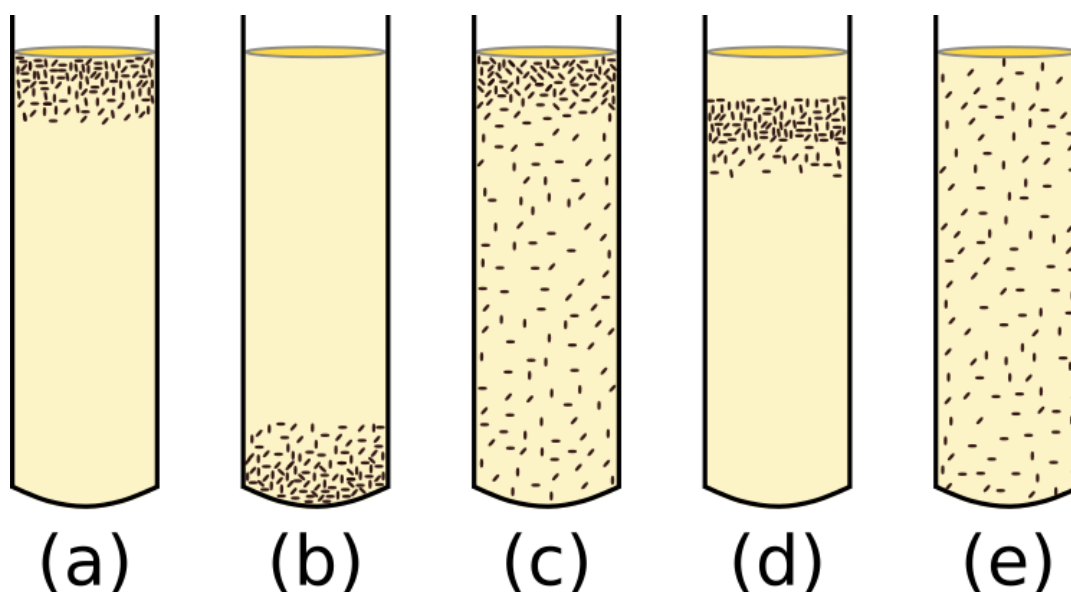


Figura 1. Identificação de bactérias anaeróbias através da capacidade de crescerem em tubos de ensaio contendo tioglicolato de sódio. Legenda : (a) bactérias aeróbias, (b) bactérias anaeróbias, (c). bactérias anaeróbias facultativas, (d) anaeróbias microaerófilas e (e) aerotolerantes. Adaptado de Prescott *et al.* (2004).

A tolerância das bactérias anaeróbias ao oxigénio livre tem sido objeto de estudo ao longo de várias décadas. Rolfe e colaboradores (1978) ao estudarem a sensibilidade de 13 estirpes de bactérias anaeróbias, verificaram que bactérias do género *Peptostreptococcus* sobreviviam até 45 minutos e bactérias do género *Clostridium* até 3 dias, quando expostas a concentrações do oxigénio atmosférico. A maior parte das bactérias usa unicamente o superóxido dismutase e a catálase para remover os radicais de oxigénio, no entanto, alguns autores verificaram que existem bactérias que utilizam outros mecanismos (e.g. *Lactobacilus planctarum*) (Morris, 1975; Prescott *et al.*, 2004; Rayan & Ray, 2004)

Os radicais de oxigénio são muito reativos e por isso letais para as bactérias, dado que reagem com outros componentes celulares (incluindo o DNA) e induzem alterações no

funcionamento de enzimas essenciais aos processos biológicos, provocando assim à morte celular (Rayan & Ray, 2004; Prescott *et al.*, 2004).

Acreditou-se por mais de um século que a produção de energia biológica dependia apenas das oxidações com o oxigénio atmosférico (Decker *et al.*, 1970). Deste modo o catabolismo de hidrocarbonetos era considerado como um processo estritamente dependente de oxigénio (Heider *et al.*, 1998). Contudo, a capacidade de algumas bactérias em produzir energia e metabolizar os hidrocarbonetos na ausência de moléculas do oxigénio veio a ser reconhecida posteriormente através de estudos microbiológicos, que demonstraram que alguns micro-organismos também são capazes de catabolizar estes compostos em condições anaeróbias (Heider *et al.*, 1998). É importante salientar que a classificação das bactérias como aeróbias, anaeróbias facultativas ou anaeróbias estritas baseia-se nos tipos de reações que empregam para gerar energia para as suas atividades (Hentges, 1996). As aeróbias necessitam de moléculas de oxigénio como aceitador de eletrões no armazenamento de energia para o seu crescimento, não se multiplicam na sua ausência, enquanto que as anaeróbias estritas morrem na presença do oxigénio, demonstrando dependerem de aceptadores alternativos ao oxigénio (Morris, 1975; Hentges, 1996). Exemplos de aceptadores alternativos incluem o nitrato ( $NO_3^-$ ), ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) ou sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) (Decker *et al.*, 1970; Heider *et al.*, 1998). Este tipo de respiração é geralmente menos eficiente que a aeróbica uma vez que os aceptadores alternativos têm menores potenciais de redução quando comparados com os do oxigénio (Prescott *et al.*, 2004).

As bactérias anaeróbias usam três processos de oxidação-redução para gerar energia. A fermentação é o principal processo através do qual o ATP é produzido (Thauer *et al.*, 1977). Outros processos incluem a respiração anaeróbica ou a dissimilação do sulfato (Morris, 1975). A fermentação é um processo que converte açúcar em outros compostos como ácido ou álcool. O processo fermentativo começa com a glicólise, tendo como produtos finais o piruvato e o NADH, sendo esta característica comum a todas as bactérias anaeróbias (Prescott *et al.*, 2004). Apesar da etapa seguinte da fermentação ser menos conservada, alguns passos foram mantidos. Estes incluem a oxidação do NADH para o NAD<sup>+</sup>, a utilização do piruvato ou dos seus derivados como aceptadores de eletrões e a produção do ATP através da fosforilação do substrato, sem a utilização do

oxigénio (Morris, 1975; Prescott *et al.*, 2004). O interesse pelo processo fermentativo vai muito além da sua relevância na saúde pública. Este processo tem um papel crucial em várias áreas da indústria (Couto & Sanromán, 2006; Ivey *et al.*, 2013; ver revisões de Bamforth, 2017) e na produção agrícola.

## 1.2. Perspetivas históricas

As primeiras descrições de infeções por bactérias anaeróbias remontam a Hipócrates, no Século IV a.C., que forneceu uma descrição clínica clara de tétano; Xenofonte, século IV A.D., que descreveu as bocas doloridas e o mau hálito de soldados na Grécia, sem dúvida representando gengivite ulcerativa necrosante aguda. Doença descrita posteriormente com precisão por John Hunter, que a diferenciou do escorbuto e de outras doenças. Em 1845, Von Langenbeck descreveu as manifestações clínicas da actinomicose (Finegold, 1993), doença causada por *Actinomyces israelii*, bactéria anaeróbia gram-positiva (Levinson, 2014).

No século XVII, Antonie van Leeuwenhoek realizou o primeiro relato sobre a existência de micro-organismos capazes de viver em condições anaeróbias. O chamado pai da microbiologia observou que alguns “*animalcules*” eram capazes de viver e mover-se na ausência de ar (Finegold, 1993). O fenómeno da anaerobiose foi posteriormente descrito por Louis Pasteur em 1862 quando descobriu a primeira bactéria anaeróbia, designada de *Clostridium butyricum* (Finegold, 1993; Bartlett, 2002; Bharadwaj, 2012). O primeiro anaeróbio patogénico para seres humanos foi *Clostridium septicum* (então chamado *Vibrion septicum*), cultivado pela primeira vez em 1877, por Pasteur e Joubert. Em 1891, foi publicado um relatório sobre o primeiro estudo de um paciente com uma infeção anaeróbia, supostamente feito por E. Levy na Alemanha (Finegold, 1993). Mais tarde, em 1893 Veillon e Zuber escreveram o primeiro relatório sobre uma bactéria anaeróbia (*Bacteroides fragilis*), isolada a partir de uma amostra clínica (Bartlett, 2002; Bharadwaj, 2012), designação atribuída em função das dificuldades que estes investigadores tiveram com o seu crescimento. Quatro anos depois, em 1897, estes investigadores publicaram um artigo descrevendo diversos tipos de anaeróbios recuperados em 25 casos de supuração gangrenada fétida, incluindo



abscesso cerebral, gangrena pulmonar, apendicite, abscesso pélvico e artrite purulenta (Bartlett, 2002).

Entre 1909 e 1938 foram desenvolvidos vários estudos, que atualmente são considerados de referência. O estudo de Schottmueller, em 1910, observou que a sépsis puerperal poderia ser causada por estreptococos do Grupo A, mas conclui que os anaeróbios eram os mais importantes. David Smith nos estudos que efetuou na universidade de Duke, entre 1927 e 1930, sobre os abscessos pulmonares, mostrou que as bactérias na fenda gengival eram idênticas às encontradas nas autópsias. Altemeier em 1938, nos seus estudos sobre sépsis intra-abdominal recuperou anaeróbios em 99 de 100 pessoas com apendicite. Ele referiu que a presença de secreção pútrida é um sinal essencial para o diagnóstico de infecção anaeróbia. (Bartlett, 2002). Nas décadas de 40 e 50, começaram a estar disponíveis compostos antibacterianos potentes (penicilina G, tetraciclina e cloranfenicol) para o tratamento de infecções anaeróbias (Finegold, 1993).

No período entre 1940 e 1960, foram praticamente negligenciadas todas as infecções causadas pelas bactérias anaeróbias, com exceção do Tétano, Botulismo e Gangrena (Bartlett, 2002). Entretanto, na década de 60, houve avanços importantes nesta área devido às investigações de Finegold, Sutter, Dowell e Holdeman, sendo por isso considerada a Era de ouro para os anaeróbios (Edmiston *et al.*, 2002).

O ano de 1965, marcou o início do renascimento da microbiologia anaeróbia, em grande parte liderado por Sidney Finegold, que é por isso, muitas vezes referido como o pai da microbiologia anaeróbia (Bartlett, 2002; Bharadwaj, 2012). A criação do primeiro sistema com atmosfera de anaerobiose, meios de culturas seletivos e protocolos específicos para isolamento e identificação das bactérias anaeróbias simplificou o estudo destas bactérias (Bartlett, 2002) e, melhorou substancialmente o conhecimento sobre a sua importância clínica (Edmiston *et al.*, 2002).

### **1.3. Taxonomia**

A classificação taxonómica das bactérias anaeróbias mudou consideravelmente ao longo dos últimos anos. Novas espécies foram descritas, e as espécies antigas foram reclassificadas (Summanen, 1993; Jousimies-Somer, 1995; Jousimies-Somer, 1997). Os

principais fatores que contribuíram para essas mudanças são as novas metodologias utilizadas em estudos taxonômicos (Jousimies-Somer, 1995). Tradicionalmente, o agrupamento de organismos anaeróbios baseava-se em características fenotípicas (e.g. reações de fermentação, perfis das enzimas, ácidos gordos metabólicos e celulares) (Summanen, 1993; Jousimies-Somer, 1997), enquanto que atualmente, as avaliações taxonômicas são baseadas em análises de ácidos nucleicos (e.g. determinação de teor de G-C, hibridação DNA-DNA e sequenciação de rRNA 16S e 23S) (Summanen, 1993; Jousimies-Somer, 1995; Jousimies-Somer, 1997). O método de sequenciação do rRNA 16S constituiu uma verdadeira revolução, não apenas a nível taxonômico, mas também na identificação de bactérias, especialmente espécies que são incultiváveis. Esses rápidos avanços têm contribuído, nos últimos anos, para várias alterações taxonômicas no grupo das bactérias anaeróbias (Jousimies-Somer, 1997).

As alterações taxonômicas mais acentuadas ocorreram no grupo dos bacilos anaeróbios Gram-negativos, particularmente no género *Bacteroides*, que perdeu a maior parte das espécies pigmentadas sacarolíticas para o género *Prevotella* e as espécies asacarolíticas para o género *Porphyromonas*. Além disso, certas espécies não-pigmentadas foram também reclassificadas como *Prevotella* ou como membro de outro género (Summanen, 1993; Jousimies-Somer, 1995; Jousimies-Somer, 1997). Nos bacilos anaeróbios Gram-positivos, ocorreram importantes reorganizações. Novas espécies foram introduzidas praticamente em todos os género, e.g. , no género *Clostridium* várias espécies foram reclassificadas para géneros novos ou outros já existentes (Vos *et al.*, 2009).

As bactérias anaeróbias, incluem quase todos os tipos morfológicos (Rayan & Ray, 2004) que abrangem desde espiroquetas, a cocos e a bacilos de Gram-positivo e Gram-negativo (Hentges, 1996). No que diz respeito às espiroquetas, os três géneros de importância médica (*Treponema*, *Leptospira* e *Borrelia*) têm sido distinguidos principalmente por caracteres morfológicos, como a natureza de sua forma espiral e o arranjo dos flagelos (Rayan & Ray, 2004). Entre as bactérias anaeróbias de Gram-positivo associadas a infeções clínicas, os cocos anaeróbios são os mais proeminentes (Murphy & Frick, 2013), sendo que as espécies com maior relevância clínica estão incluídos principalmente no género *Peptostreptococcus* (Rayan & Ray, 2004) e, algumas nos géneros *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus* (Murphy & Frick, 2013). No que diz respeito aos cocos de Gram-negativo anaeróbios, apenas o

gênero *Veillonella* é encontrado em amostras clínicas (Wells & Wilkins, 1996). Entre os bacilos Gram-positivos, os gêneros clinicamente mais importantes são os *Actinomyces*, *Propionibacterium* e *Clostridium*. Os bacilos de Gram-negativos isolados com mais frequência no homem pertencem aos gêneros *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* (Finegold & Wexler, 1996a). Apesar da vasta diversidade de bactérias anaeróbias, neste trabalho detalhar-se-ão apenas as classificações taxonômicas dos bacilos, concretamente os gêneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium* (Figura 2).

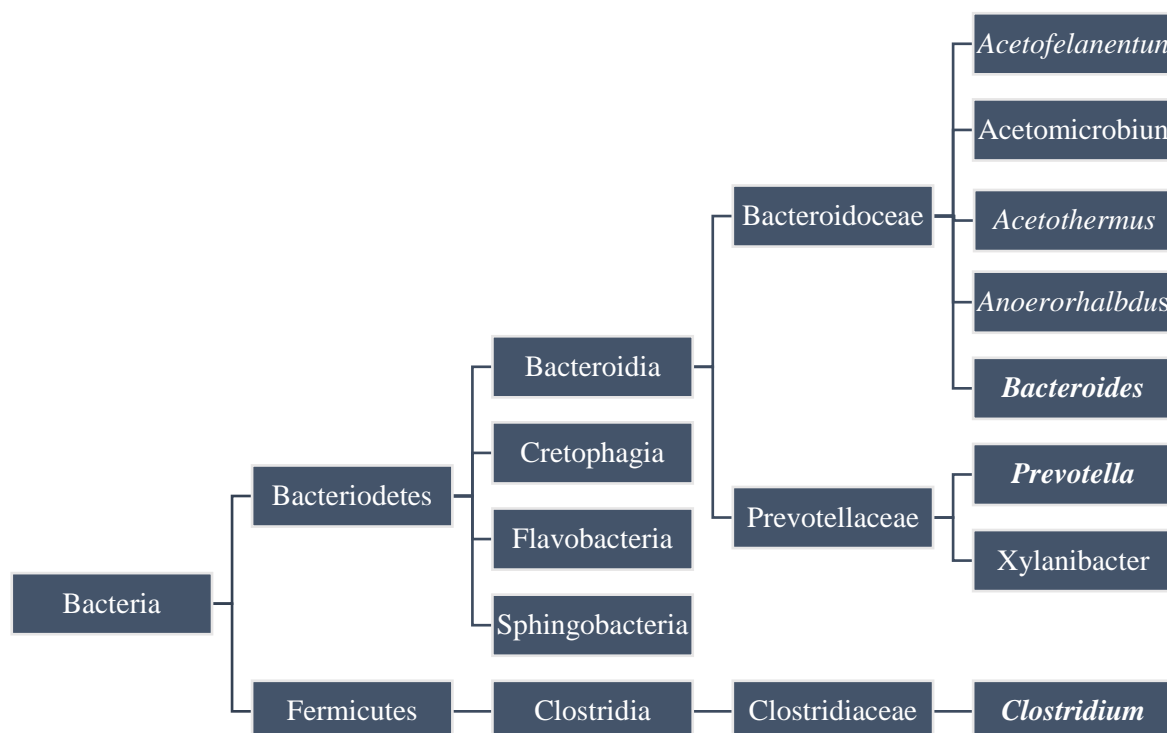


Figura 2 - Posição taxonômica dos três principais grupos de bactérias anaeróbias desde reino até o gênero. Os dois maiores grupos destas bactérias clinicamente significativas, *Bacteroides* e *Prevotella*, compartilham basicamente a mesma classificação taxonômica. O gênero *Clostridium*, também clinicamente significativo, é mais distante filogeneticamente do que *Bacteroides* e *Prevotella*. Adaptado de Kreig *et al.* (2010).

Os *Bacteroides* fazem parte do filo Bacteroidetes, que agrupa bacilos Gram-negativos não formadores de esporos e fenotipicamente diversificados. O filo contém quatro classes: Bacteroidia, Cytophagia, Flavobacteriia e Sphingobacteria. Atualmente a família Bacteroidaceae contém cinco gêneros: *Acetoflanentum*, *Acetomicrobium*, *Acetothermus*, *Anaerorhabdus* e *Bacteroides*. Os gêneros *Anaerophaga* e *Megamonas*,

anteriormente classificados nesta família foram transferidos para a família Marinilabiliaceae e Firmicutes, respetivamente (Krieg *et al.*, 2010).

A taxonomia do género *Bacteroides* sofreu grandes mudanças nos últimos anos (Wexler, 2007; Krieg *et al.*, 2010). Este género compreendia mais de 60 espécies que exibiam uma variedade morfológica e eram bioquímica e fisiologicamente heterogéneas. No entanto, os dados bioquímicos, e de biologia molecular indicam que *Bacteroides fragilis* e organismos intimamente relacionados formam um grupo taxonómico coerente. Daí a proposta de Shah e Collins para restringir o género ao *B. fragilis* e organismos intimamente relacionados (Shah & Collins, 1989; Krieg *et al.*, 2010). Entretanto com base nas técnicas de biologia molecular, tais como a hibridação DNA-DNA e a sequenciação de genes 16S rRNA tem vindo a clarificar a estrutura inter e intragénica de *Bacteroides*. Os *Bacteroides* podem ser diferenciados de outros géneros relacionados pela análise de genes 16S rRNA, isto porque os membros formam um cluster distinto no subgrupo *Bacteroides* com semelhança inter-espécies de aproximadamente 93% (Krieg *et al.*, 2010).

As espécies do género *Bacteroides* são bactérias anaeróbias obrigatórias, bacilos Gram-negativas com extremidades arredondadas, não formadoras de esporos. Na sua maioria são sacarólíticas, normalmente hidrolisam a escolina, não reduzem o nitrato a nitrito, são resistentes à bÍlis e são imóveis (Krieg *et al.*, 2010; Wexler, 2007) com a exceção de *Bacteroides helcogenes*, *Bacteroides pyogenes* e algumas estirpes de *Bacteroides uniformis*. Estas bactérias possuem 1,2 a 1,5 µm de comprimento e 0,5 a 2µm de largura, apresentam um crescimento mais rápido a 37°C e pH próximo de 7,0. As suas colónias em gelose sangue são lisas, circulares, convexas, de cor branca acinzentada e com tamanho que varia entre 1 a 3 mm. São resistentes à vancomicina, kanamicina e colistina. O teor de G-C do DNA é de 39-40%. As espécies deste género diferenciam-se das de outros géneros estritamente relacionados por serem resistentes à bÍlis, não pigmentadas e altamente fermentativas, contrariamente às espécies asacarólíticas do género *Porphyromonas* e espécies sacarólíticas moderadas de género *Prevotella*. Além disso, todas as espécies de *Bacteroides* descritas possuem as enzimas glucose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, o que as difere de outros géneros (Krieg *et al.*, 2010).

O género *Prevotella* partilha da mesma classificação taxonómica que o género *Bacteroides*. Entretanto, diferentemente dos membros do género *Bacteroides*, o género *Prevotella* pertence à família Prevotellaceae. Esta família é atualmente constituída por apenas dois géneros, *Prevotella* e *Xylanibacter* (Krieg *et al.*, 2010). O género *Prevotella* é composto essencialmente por espécies sacarolíticas, pigmentadas ou não, que anteriormente pertenciam ao género *Bacteroides* (Jousimies-Somer, 1995; Finegold & Jousimies-Somer, 1997; Jousimies-Somer, 1997; Krieg *et al.*, 2010). Neste momento, o género *Prevotella* inclui cerca de 34 espécies publicadas no Manual Bergey Sistemática de Bacteriologia. São bacilos anaeróbios de Gram-negativo, curtos, não formadores de esporos, imóveis e sensíveis à biliar. São ainda sacarolíticas moderadas e os principais produtos metabólicos são os ácidos succínico e acético (Krieg *et al.*, 2010). A maioria das espécies não são pigmentadas, as pigmentadas produzem colónias pretas, castanhas ou beges em placas de gelose sangue. Estas podem crescer rapidamente mas para se manterem viáveis é necessário subculturas diárias (Shah & Gharbia, 1992).

O género *Clostridium* é um dos géneros da família Clostridiaceae, pertencente a ordem Clostridiales, classe Clostridia do filo Firmicutes (Vos *et al.*, 2009). Este filo engloba pelo menos 26 famílias e 223 géneros. É um grupo altamente diversificado de bactérias anaeróbias obrigatórias formadoras de esporos (Dohrmann *et al.*, 2015). Todos os membros possuem uma parede celular rígida que contém ácido murâmico ou, em alguns casos, ácido teicoico. A classe Clostridia e a ordem Clostridiales são fenotípicas, quimiotaxonomica e fisiologicamente diversas. Ambas contêm organismos de Gram-positivo e negativo e formam um *cluster* filogeneticamente coerente com base na análise de 16S rRNA (Vos *et al.*, 2009). A classe Clostridia inclui para além da ordem Clostridiales, a ordem Halanaerobiales e Thermoanaerobacterales. A ordem Clostridiales compreende 19 famílias das quais pelo menos 10 estão validadas. A família Clostridiaceae é a principal família dentro da ordem Clostridiales, e contém pelo menos 13 géneros reconhecidos, incluindo o género *Clostridium* que compreende cerca de 168 espécies validadas (Vos *et al.*, 2009). Este género é heterogêneo, com várias espécies filogeneticamente próximas de outros géneros (Collins *et al.*, 1994; Dohrmann *et al.*, 2015), em muitas a sua inclusão no género *Clostridium* é incerta (Vos *et al.*, 2009). Por esta razão, o género *Clostridium* e bactérias filogeneticamente relacionadas foram divididas em 19 clusters distintos. A maioria dos clusters contém espécies de

gêneros que não são *Clostridium*, (e.g. *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Peptostreptococcus* e *Faecalibacterium*) (Maukonen *et al.*, 2006).

O *cluster* I que inclui o gênero *Clostridium sensu stricto*, é um *cluster* filogeneticamente bem definido e compreende quase metade das espécies desse gênero (Collins *et al.*, 1994) assim como, a maior parte das espécies clinicamente relevantes (Maukonen *et al.*, 2006). Os membros deste cluster exibem níveis relativamente elevados de similaridade intra-*cluster* (geralmente >90%), apesar de possuírem fenótipos marcadamente diferentes. Por exemplo, o grupo inclui espécies sacarolíticas e proteolíticas bem como psicrófilos, mesófilos e termófilos (Collins *et al.*, 1994). As bactérias do gênero *Clostridium* predominantes no intestino pertencem principalmente aos clusters XIVa (grupo de *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*) e IV (grupo de *Clostridium leptum*) (Maukonen *et al.*, 2006).

#### **1.4. Epidemiologia das infecções bacterianas**

Em todo o mundo as infecções por bactérias constituem um importante problema de saúde pública, sendo responsável por cerca de 55% das doenças infecciosas emergentes (Jones *et al.*, 2008), algumas das quais são infecções persistentes devido à formação de biofilmes (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Para que haja uma infecção, uma bactéria deve i) conseguir um contacto com o hospedeiro, ii) aderir, colonizar e invadi-lo, iii) multiplica-se no seu interior, iv) diminuir/bloquear as suas defesas e v) danificar as suas células (Prescott *et al.*, 2004; Siegel & Weiser, 2015).

De entre todas as bactérias existentes só uma pequena percentagem causa doenças ao homem. Estima-se que milhões de pessoas são infetadas anualmente por bactérias transmitidas por diferentes vias, como a: aérea, por vetores, por contacto direto ou por contaminação de água ou alimentos (Prescott *et al.*, 2004). As infeções bacterianas são muitas vezes oportunistas, como por exemplo, em pacientes imunodeprimidos onde são reportadas com frequência, sendo essa frequência associada a vários fatores como a obesidade ou o número de células CD4 (O'Connor *et al.*, 2017).

A incidência de infeções por bactérias anaeróbias é relativamente baixa. Uma variedade de estudos, de diferentes anos e de vários países, estimaram a incidência de bacteriemia anaeróbia (Tabela 1) (Goldstein, 1996; Urbán, 2012). No entanto, esta taxa varia consideravelmente de acordo com a natureza da infeção. Estas infeções estão associadas a uma taxa de mortalidade significativa, com alguns estudos a estimar que a taxa de letalidade em pacientes com bacteriemia anaeróbia, clinicamente significativa, varia de 25 a 44%.

Tabela 1 - Incidência de bacteremia anaeróbia analisadas a partir de hemocultura realizadas em vários estudos de diferentes países e anos. Legenda: NA = não avaliado. Adaptado de Goldstein (1996).

<b>País (ano de estudo)</b>	<b>Hemoculturas efetuadas</b>	<b>Hemoculturas positivas</b>	<b>Números (%) de hemoculturas positivas para anaeróbios</b>
França (1947)	8620	2362	84 (3,8)
Estados Unidos (1967)	15543	2410	NA
Estados Unidos (1969)	81000	NA	NA
Estados Unidos (1972)	4816	261	20 (7,7)
Estados Unidos (1971)	38817	3795	447 (11,8)
Estados Unidos (1993)	7397	569	35 (6,2)
Itália (1995)	53788	6378	255 (4)
Coreia do Sul (1985)	78732	12963	350 (2,7)
Coreia do Sul (1996)	207877	17462	813 (4,6)

Segundo alguns autores cerca de 5% das bacteriemias envolvem esses organismos. O abscesso cerebral pode envolver esses organismos em mais de 80% dos casos; infeções na cirurgia de cabeça e pescoço, 95-100%; sinusite crônica e otite média, mais de 50%; infeções dentárias e orais, 90-100%; infeções pleuropulmonares, mais de 75%; infeções intra-abdominais, 50-90%; infeções do trato genital feminino, 50-75% ou mais;



abscessos de mama não puerperais, 50-80% e úlceras de pé diabético, 85-95% (Finegold, 1995).

#### **1.4.1. Infecções causadas por bactérias anaeróbias**

As bactérias anaeróbias, como componente principal da microflora humana, são capazes de colonizar vários sistemas do nosso corpo, apesar do nosso constante contacto com o ar. Isto acontece pela presença de organismos facultativos cujo metabolismo reduz o oxigénio e diminui o potencial local de oxidação-redução. A pele, as fendas gengivais, o tecido linfóide da garganta e o lúmen do trato intestinal e urogenital são os locais mais suscetíveis de serem colonizados por estas bactérias (Rayan & Ray, 2004).

A composição da flora anaeróbica normal varia significativamente de acordo com a região do corpo humano. A composição da flora da pele da região perioral, perineal e genitais externos aproxima-se da cavidade oral, intestinal e vaginal, respetivamente. O *Propionibacterium acnes* é o anaeróbio colonizante predominante (100 a 1000 vezes mais prevalente que os demais anaeróbios). No entanto, existem outros anaeróbios colonizantes que aparecem com menor frequência (e.g., *Propionibacterium granulosum*, *Propionibacterium avidum* e *Peptostreptococcus spp*) (Brook, 2008). A cavidade oral possui uma flora anaeróbia indígena muito complexa que varia, quantitativa e qualitativamente, consoante a idade, a localização anatómica da amostragem e o nível de higiene bucal. Os cocos anaeróbios Gram-positivos, o género *Prevotella* (*P. oris*, *P. buccae* e *P. oralis*), *Bacteroides não-fragilis*, as espécies de *Porphyromonas* pigmentados e *Fusobacterium* (*F. nucleatum* e *F. necrophorum*) são as espécies anaeróbias mais frequentemente isoladas na flora da cavidade oral. No trato intestinal, as espécies isoladas com mais frequência são as do género *Bacteroides*, mais especificamente *B. fragilis* e *B. thetaiotaomicron*, juntamente com *Clostridium* e cocos anaeróbios. Na flora vaginal, os bacilos anaeróbios Gram-negativos que predominam são as espécies pigmentadas de *Prevotella* (e.g. *P. bivia* e *P. disiens*) e *Porphyromonas*. Outros micro-organismos importantes desta flora são os *Lactobacilos* e *Peptostreptococos*, produtores de peróxido de hidrogénio (Nagy, 2010).

Apesar das bactérias anaeróbias constituintes o grupo mais numeroso de micro-organismos da microbiota humana, podem em circunstâncias particulares atuar como



patogênicos oportunistas, sobretudo em locais contíguos a estruturas colonizadas. Conhecer a composição geral da flora microbiana humana nos diferentes locais permite estimar que micro-organismos poderão estar implicados em processos infecciosos adjacentes. Uma parte significativa das infecções são causadas quando estas colonizam áreas normalmente estéreis (Rayan & Ray, 2004; Nagy, 2010), ou quando há defeitos estruturais ou funcionais no seu habitat normal. Isso pode ocorrer por interrupção das barreiras como a mucosa, obstrução orgânica ou mecânica do trânsito gastrointestinal ou qualquer outro processo patológico que compromete o potencial de oxidação-redução nos tecidos, incentivando assim o rápido crescimento dos anaeróbios (Edmiston *et al.*, 2002). Segundo estes autores, os principais fatores predisponentes incluem:

- Doença metabólica ou do sistema imunológico,
- Diabetes *mellitus*,
- Neutropenia,
- Hipogamaglobulinémia,
- Situações oncológicas (Malignidades de tumores sólidos e hematológicas),
- Terapia citotóxicos ou corticosteroides,
- Alteração do potencial de redução da oxidação do tecido,
- Obstrução e estase,
- Anoxia tecidual,
- Trauma aos tecidos (feridas, mordidas ou cirurgia),
- Insuficiência vascular,

Também são relevantes, fatores como o número de organismos que entram nos tecidos mais profundos (tamanho do inóculo) e fatores de virulência (toxinas, enzimas e outras substâncias) produzidos por anaeróbios, independentemente do estado imunológico de hospedeiro (Finegold, 1995).

Praticamente todos os tipos de infecções que ocorrem em seres humanos podem envolver bactérias anaeróbias e nenhum órgão ou tecido do corpo é imune à infecção por esses organismos. De modo genérico, existem quatro principais locais de infecção anaeróbica: pleuropulmonar, intra-abdominal, genital feminina, e infecções na pele e nos tecidos moles (com ou sem envolvimento do osso subjacente). Entretanto, existem outras

infecções menos comuns que envolvem principalmente bactérias anaeróbias (e.g., abscesso cerebral, infecções de feridas mordidas) (Finegold, 1995).

Na maioria das vezes, as bactérias anaeróbias são encontradas em infecções mistas, embora a monoinfecção também ocorra. Tal como acontece com outras infecções bacterianas, elas podem disseminar para além do local afetado e entrar na corrente sanguínea (Finegold, 1995; Nagy, 2010). A bacteriemia anaeróbia é geralmente secundária a uma infecção iniciada no trato respiratório, na cavidade oral, no intestino, no trato genital feminino ou nos tecidos moles (Nagy, 2010).

Tabela 2 - Local habitual de anaeróbios oportunistas. Adaptado de Rayan & Ray (2004).

Organismos	Classificação morfológica	Local habitual			
		Boca e Faringe	Intestino	Trato Urogenital	Pele
<i>Peptostreptococcus</i>	Cocos positivos	Sim	Sim	Sim	Não
<i>Propionibacterium</i>	Bacilos Positivos	Não	Não	Não	Sim
<i>Clostridium</i>	Bacilos Positivos (grande)	Não	Sim	Não	Não
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i>	Bacilos Negativos (Cocobacilos)	Não	Sim	Não	Não
<i>Fusobacterium</i>	Bacilos Negativos (alongados)	Sim	Sim	Não	Não
<i>Prevotella</i>	Bacilos Negativos	Sim		Sim	Não
<i>Porphyromonas</i>	Bacilos negativos	Sim		Sim	

As infecções pulmonares, nas quais predominam as bactérias anaeróbias são mais comumente associadas à aspiração de material orofaríngeo ou ocorrem como complicação da doença periodontal. Os organismos mais comuns nestas infecções são originários das vias aéreas superiores e da cavidade oral, e incluem *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* e *Peptostreptococcus spp.* (Marik, 2001; Brook, 2008; Nagy, 2010). As infecções intra-abdominais geralmente ocorrem após a entrada de organismos entéricos na cavidade peritoneal ou visceral através de alteração da parede intestinal. Os bacilos anaeróbios Gram-negativos (grupo *Bacteroides fragilis*, *Prevotella pigmentada* e *Porphyromonas*), *Peptostreptococcus* e *Clostridium spp* podem causar infecções mistas com bactérias aeróbias após a contaminação de local geralmente estéril. Anaeróbios originários da flora vaginal são encontrados em abscessos pélvicos, abortos sépticos, endometriose, abscesso tubo-ovariano, doenças inflamatórias pélvicas e infecções pós-

operatórias. Os principais micro-organismos isolados destas infecções são *B. fragilis*, *P. bivia*, *P. disiens*, *P. melaninogenica*, *Peptostreptococci* e *Clostridium*. As infecções da pele e dos tecidos moles são causadas mais frequentemente pela contaminação com a flora fecal ou oral. Infecções anaeróbias de osso e articulações, como a osteomielite ou a artrite séptica, são raras, mas normalmente são consequência de contaminação a partir de tecidos moles adjacentes infetados. As espécies de *Fusobacterium* são os anaeróbios Gram-negativos mais frequentemente isolados das articulações infetadas (Brook, 2008; Nagy, 2010)

#### 1.4.1.1. *Bacteroides*

As bactérias do género *Bacteroides* representam cerca de 25% da comunidade bacteriana no colon humano, com o qual mantêm uma relação complexa, mas benéfica. Esta flora é transferida de mãe para filhos durante o nascimento aquando a passagem pela vagina, pelo que está presente no recém-nascido desde dos primeiros dias de vida.

Os *Bacteroides* quando saem do seu habitat normal podem causar patologias significativas, incluindo a septicemia e formação de abscessos em múltiplos locais do corpo (Wexler, 2007; Tong *et al.*, 2011).

Tabela 3 - Espécies de grupo *B. fragilis* mais frequentemente isoladas em amostras clínicas e os locais de infeção. Adaptado de Wexler (2007).

<b>Grupo <i>B. fragilis</i></b>	<b>Tipo / Local de infeção</b>
<i>B. Fragilis</i>	
<i>B. thetaiotaomicron</i>	Infeções abdominais, peritonites, infeções ginecológicas,
<i>Bacteroides distasonis</i>	abscessos periodonticos, pneumonia por aspiração,
<i>Bacteroides ovatus</i>	abscessos pulmonares, infeções neonatais, bacteremia.
<i>Bacteroides vulgatus</i>	

As espécies do grupo *B. fragilis* são as espécies anaeróbias recuperadas com maior frequência nas amostras clínicas (Tabela 3), sendo a espécie *B. fragilis* a mais relevante do ponto de vista clínico-patológico. Apesar de corresponder apenas a 0,5% da microbiota intestinal, esta é a mais frequentemente isolada. Estes agentes patogénicos

são frequentemente associados a infecções polimicrobianas tais como infecções intra-abdominais, obstétrico-ginecológicas, e infecções da pele. Vários fatores de virulência contribuem para patogenicidade das bactérias do género *Bacteroides*: *pili*/fímbrias, metaloproteases, superóxido dismutase, enterotoxinas e pelo menos oito polissacáridos capsulares cujas propriedades imunogénicas, em especial as do *B. fragilis*, são responsáveis pela sua capacidade indutora de abscessos (Wexler, 2007).

Este grupo incluindo a espécie *B. fragilis*, representam aproximadamente 55% das bacteriemias anaeróbias e está associada a uma mortalidade de 19% (Goldstein, 1996).

#### 1.4.1.2. *Prevotella*

As bactérias do género *Prevotella* são, depois do grupo *B. fragilis* e dos cocos anaeróbios Gram-positivos, um dos grupos mais frequentemente encontrado nas infecções humanas causadas por bactérias anaeróbias. As espécies de *Prevotella*, principalmente as pigmentadas, são encontradas predominantemente na flora oral e vaginal, sendo isoladas em infecções mistas relacionadas com estes locais, mas também podem ser isoladas de outras infecções (Jousimies-Somer, 1995). São recuperadas com frequência em doenças periodontais, abscessos e queimaduras nas proximidades da boca, mordeduras, paroníquia, infeção do trato urinário, osteomielite, e de outras entidades com ponto de partida na cavidade oral (pneumonia por aspiração, abscesso pulmonar, empiema pulmonar, otite média crónica, sinusite, abscessos cervicais profundos, abscessos cerebrais e bacteremia). Entre as espécies *Prevotella* sensíveis à biliar, as que apresentam maior relevância clínica são *P. melaninogenica*, *P. intermedia*, *P. oris* e *P. buccae* (Tabela 4) (Nagy *et al.*, 2015).

Tabela 4 - Espécies de *Prevotella* mais frequentemente isoladas em amostras clínicas e os principais locais de infeção. Adaptado de Jousimies-Somer (1995)

Espécies de <i>Prevotella</i>	Tipo/local de infeção
-------------------------------	-----------------------

<i>Prevotella melaninogenica</i>	Infecções orofaciais, pneumonia de aspiração, periodontite
<i>Prevotella intermedia</i>	
<i>Prevotella oralis</i>	Infecções orofaciais e intra-abdominais
<i>Prevotella oris</i>	
<i>Prevotella buccae</i>	
<i>Prevotella bivia</i>	Infecções ginecológicas / obstétricas
<i>Prevotella disiens</i>	

#### 1.4.1.3. *Clostridium*

São importantes constituintes da microbiota intestinal dos vertebrados, sendo encontrados nos humanos como membro colonizante do trato intestinal (Tabela 2). A bactéria tem distribuição ubiquitária nos solos e objetos contaminados com excretos animais (esporos e formas vegetativas). Em condições adversas, os clostrídios entram em fase de esporulação, desenvolvendo um esporo terminal que pode auxiliar na sua identificação. (Rayan & Ray, 2004). Os clostrídios predominantes na flora intestinal pertencem principalmente aos *clusters* XIVa (grupo *Clostridium coccoides-Eubacterium rectale*) e IV (grupo de *Clostridium leptum*), enquanto que a maior parte dos clostrídios com importância médica pertencem ao *cluster* I (Tabela 5) (Maukonen *et al.*, 2006), são e.g., *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. botulinum* e *C. difficile*. Estes clostrídios são potentes produtores de várias histotoxinas proteicas, o que justifica a sua extrema virulência e implicação em quadros infecciosos agressivos, sistêmicos e potencialmente fatais (Rayan & Ray, 2004). Contudo, é importante salientar que este género é o único que compreende espécies de bactérias anaeróbias capazes de causar infeções exógenas e nosocomiais. (Finegold, 1995; Halstead *et al.*, 2016).

Tabela 5 – Algumas espécies clinicamente relevantes do *cluster* I e as doenças associadas Adaptado de Dohrmann *et al.* (2015)

<b><i>Clostridium</i> cluster I</b>	<b>Doenças associadas</b>
<i>Clostridium perfringens</i>	Gangrena de gás
<i>Clostridium tetani</i>	Doença do tétano

---

*Clostridium botulinum*      Botulismo (causada pela neurotoxina botulínica)

---

### 1.5. Diagnóstico laboratorial

O sucesso do laboratório de microbiologia clínica no diagnóstico de bactérias anaeróbias é geralmente afetada pela seleção da amostra, método de colheita, transporte e processamento das amostras. O isolamento e identificação destas bactérias é possível desde que todos os procedimentos acima referidos sejam adequadamente executados (Dowell & Hawkins, 1974; Chemother, 2011). Uma amostra de alta qualidade é a chave para a detecção de anaeróbios em qualquer infecção. Como referida anteriormente, as infecções por anaeróbios são originadas principalmente por bactérias da microbiota. Para obter uma amostra viável é necessário obedecer a protocolos pré-estabelecidos para a colheita, que podem ser classificados como “aceitáveis” e “não aceitáveis”. (Tabela 6). As amostras clínicas adequadas para o isolamento de bactérias anaeróbias incluem a recolha assética de fluidos estéreis (sangue, líquido pleural, sinovial, cefalorraquidiano, amostras colhidas em cirurgias de locais asséticos ou biópsias), fluidos colhidos por punção pulmonar percutânea e pus colhido de abscessos fechados (Tabela 6 A). A aspiração percutânea de abscesso com agulha (Figura 3 A, C, D) exige a descontaminação da superfície e a obtenção de pelo menos 2 ml de exsudado, que deve ser imediatamente inoculado num meio de transporte em anaerobiose (Figura 4). A aspiração direta da amostra com agulha e seringa são geralmente considerados o melhor método para obtenção das amostra para a cultura, enquanto que a colheita por outro meio, principalmente por zaragatoa não é recomendadas por causa da elevada probabilidade de contaminação, exposição ao ar e quantidade diminuta de amostra (Tabela 6) (Dowell & Hawkins, 1974; Brook, 2008; Chemother, 2011). Quando inevitável a execução da colheita por este método (zaragatoa), devem-se utilizar os *kits* existentes para o efeito (Hentges, 1996; Brook, 2008).

Tabela 6 - Procedimentos de colheita de amostra para cultura anaeróbia. Adaptado de Brook (2008).

Procedimentos aceitáveis (A)
Aspiração com agulha de fluidos biológicos estéreis *
Aspiração transtraqueal percutânea

Punção pulmonar transtorácica
Lavado broncoalveolar com cateter protegido (duplo lúmen) $\Delta$
Culdocentese após descontaminação vaginal
Aspirados percutânea ou transmucosa de abscesso fechados
Fluidos coletados por punção e aspiração de abscesso de cavidade oral
Urina obtida por aspiração de vesícula suprapúbica
<b>Procedimentos não aceitáveis (B)</b>
Zaragatoa de nasofaringe e gengiva
Zaragatoa ou aspiração de exsudado de úlceras e feridas superficial
Colheita de expetoração
Zaragatoa uretral, vaginal ou cervical
Colheita de fezes #
Urina de jato médio ou cateterizada

\* Sangue, líquido pleural, peritoneal, sinovial, cefalorraquidiano e fluidos articulares;  $\Delta$  A cultura deve ser realizada segundo método quantitativo; # Exceto para pesquisa de toxina de *Clostridium difficile*.

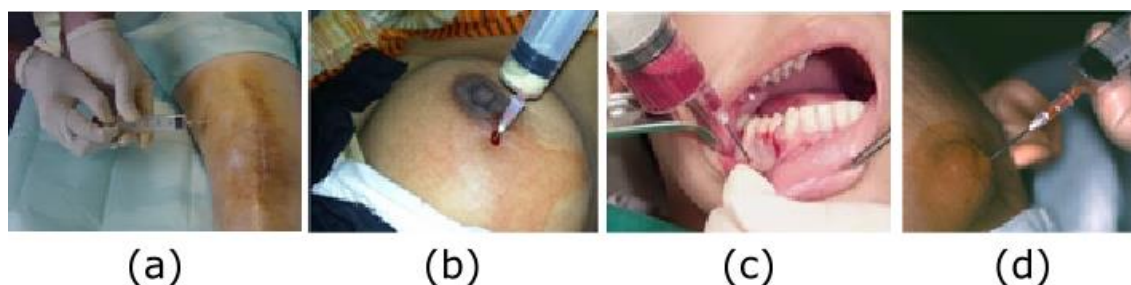


Figura 3 - Recolha de amostras por punção aspirativa para o diagnóstico de bactérias anaeróbias por cultura. Legenda: a e b - Aspiração percutânea de abscesso fechados de tecidos moles; c - Fluidos recolhidos por punção aspirativa de abscesso de cavidade oral; d - Pus recolhido por punção aspirativa de abscesso fechado submandibular

Assim como a colheita, o transporte adequado de amostras é um procedimento crucial para o diagnóstico das bactérias anaeróbias. Idealmente, as amostras deveriam ser inoculadas imediatamente após a colheita, de modo a proteger os organismos de efeitos deletérios do oxigénio. Na prática não é possível a inoculação imediato das amostras,

pelo que estas devem ser transportadas em meios de transportes com atmosfera controlada (Figura 4A). Comercialmente estão disponíveis meios de transporte adequados ao acondicionamento em anaerobiose de fluidos biológicos e de biopsias (Rayan & Ray, 2004; Brook, 2008; Chemother, 2011). As amostras aspiradas com agulha e seringa devem ser injetadas diretamente através da tampa de borracha no frasco que possui, por norma, um meio semi-sólido, estéril, pré-reduzido, isto é, em atmosfera anóxica, contendo um indicador de oxirredução. Este meio de transporte mantém, a maioria dos anaeróbios, viáveis até o seu processamento no laboratório (Hentges, 1996; Brook, 2008). Quando as amostras são colhidas para tubos esterilizados (opção menos favorável), a quantidade de amostra deve ser a maior possível para que a exposição ao ar possa ser minimizada. Ao contrário das recomendações de outrora, as seringas usadas para aspiração não devem ser utilizadas para o transporte das amostras porque o oxigénio difunde em seringas de plástico após de 30 minutos, existe o risco de derramamento de seu conteúdo e porque existe ainda um risco potencial de lesões com a agulha (Brook, 2008)

Num meio de transporte adequado, as bactérias anaeróbias podem sobreviver até vários dias de acordo com o tipo de amostras. Amostras purulentas contêm inúmeros compostos redutores tendo estas maior viabilidade de que os líquidos biológicos. Contudo, recomenda-se o transporte célere das amostras para o laboratório de microbiologia, com vista a evitar o sobre crescimento de anaeróbios facultativos, em detrimento de estirpes mais fastidiosas (Jousimies-Somer & Finegold, 1984; Brook, 2008; Nagy, 2010). Embora alguns dos sistemas de transporte possam suportar a viabilidade de organismos anaeróbios por até 24 horas, todas as amostras devem ser transportadas e processadas o mais rapidamente possível após a colheita (Brook, 2008) ou seja, mesmo quando os meios de transporte são utilizados, recomenda-se iniciar a inoculação nos meios de cultura no período de 3 a 6 horas (Chemother, 2011).

O transporte deve ser realizado à temperatura ambiente, nunca refrigerado (Dowell & Hawkins, 1974; Brook, 2008) nem excedendo os 37°C. A refrigeração é prejudicial para alguns anaeróbios porque a absorção de oxigénio é maior a temperaturas mais baixas. Por outro lado, o armazenamento a altas temperaturas pode causar sobre crescimento bacteriano ou perda de algumas estirpes (Brook, 2008).



### 1.5.1. Identificação das bactérias anaeróbias por cultura

O diagnóstico laboratorial de anaeróbios é constituído por um conjunto de procedimentos que começa com o exame macroscópico das amostras, que de uma forma geral, consiste na observação da aparência grosseira das amostras. Estas são frequentemente purulentas, e o cheiro putrefacto ou fétido numa amostra clínica é quase sempre associando à presença de anaeróbios, características que devem à produção por estes organismos de compostos voláteis, tais como, ácidos gordos de cadeia curta e aminas (Brook, 2008; Chemother, 2011). Para além do exame macroscópico, a coloração pelo método de Gram fornece dados sobre a morfologia e estrutura da parede dos micro-organismos presentes, permitindo seleccionar meios de cultura e período de incubação (Dowell & Hawkins, 1974; Brook, 2008; Chemother, 2011). Devido à natureza tipicamente lenta e complicada da cultura anaeróbica, este exame fornece frequentemente informações preliminares úteis para a tomada de decisão clínica na terapia inicial apropriada (Rayan & Ray, 2004).

O isolamento das bactérias anaeróbias por cultura requer o uso de meios específicos e uma atmosfera de incubação anaeróbica, que em condições ideais implica que estes meios devem estar armazenados sem exposição ao oxigénio, isto é, em câmara de anaerobiose. Na rotina dos laboratórios de microbiologia clínica esta prática não é frequente, utilizando-se em vez das câmaras, jarros e sacos em que se cria uma atmosfera de anaerobiose. A escolha dos meios para uso no laboratório de anaeróbios é fundamental, o meio deve conter nutrientes adequados e suplementos necessários para crescimento dos anaeróbios clinicamente significativos. Uma variedade de meios enriquecidos, não seletivos, seletivos e diferenciais devem ser utilizadas para o processamento inicial, isolamento e identificação de bactérias anaeróbicas a partir das amostras clínicas. Como requisito mínimo para o isolamento de anaeróbios, as amostras devem ser inoculadas em meios de gelose de sangue não seletivo, pré-reduzido e enriquecido com fitomenadiona (vitamina K<sub>1</sub>) e hemina (Figura 4B), tais como agar de *Brucella*, *Trypticase soy* agar ou agar *Schaedler*, (Brook, 2008). Os meios suplementados com fatores de crescimento como vitamina K e hemina, e agentes redutores como cistina e tioglicolato torna um meio altamente nutritivo e apropriado para o crescimento de anaeróbios (Lagier *et al.*, 2015). A hemina e o heme,

provenientes do sangue de carneiro, são indispensáveis a uma variedade de anaeróbios e promovem o seu crescimento. A vitamina K é fundamental para certas estirpes de *Prevotella melaninogenica* e potencia o crescimento de algumas estirpes de *Bacteroides* (BD, ). Os agentes redutores cistina e tioglicolato ajudam a diminuir a concentração do oxigénio no meio (Lagier *et al.*, 2015). Devido à natureza tipicamente polimicrobiana da maioria das infeções anaeróbicas, é necessário utilizar meios seletivos para proteger os anaeróbios fastidiosos de serem ocultados por outros anaeróbios (Rayan & Ray, 2004). Existem vários meios seletivos para o crescimento de algumas espécies de bactérias anaeróbias, como por exemplo, o meio *Kanamycin-vancomycin Laked blood* agar, que possibilita o isolamento seletivo de anaeróbios de Gram negativos (*Prevotella* e *Bacteroides*), *Bacteroides bile esculin* agar que permite o crescimento do grupo *B. fragilis* e *Bilophila wadsworthia*, o meio *Phenylethyl alcohol shepp blood* agar que inibe o crescimento dos anaeróbios facultativos de Gram negativos e meios enriquecidos com gema de ovo e neomicina que podem ser usados para o crescimento seletivo de *Clostridium* (Brook, 2008; Pfaller *et al.*, 2015). Além dos meios descritos encontra-se disponível no mercado uma vasta gama de meios de culturas, sendo que a escolha deve ser feita mediante as necessidades de cada laboratório.

As amostras devem ser incubadas a 35-37°C em aerobiose e anaerobiose para a distinção dos anaeróbios facultativos (Dowell & Hawkins, 1974), sendo que as placas para a atmosfera de anaerobiose devem ser inoculadas o mais rapidamente possível. A observação da cultura primária só deve ser efetuada após 48 horas de incubação e deve ser mantida até 7 dias, antes de ser considerada negativa (Dowell & Hawkins, 1974; Chemother, 2011).

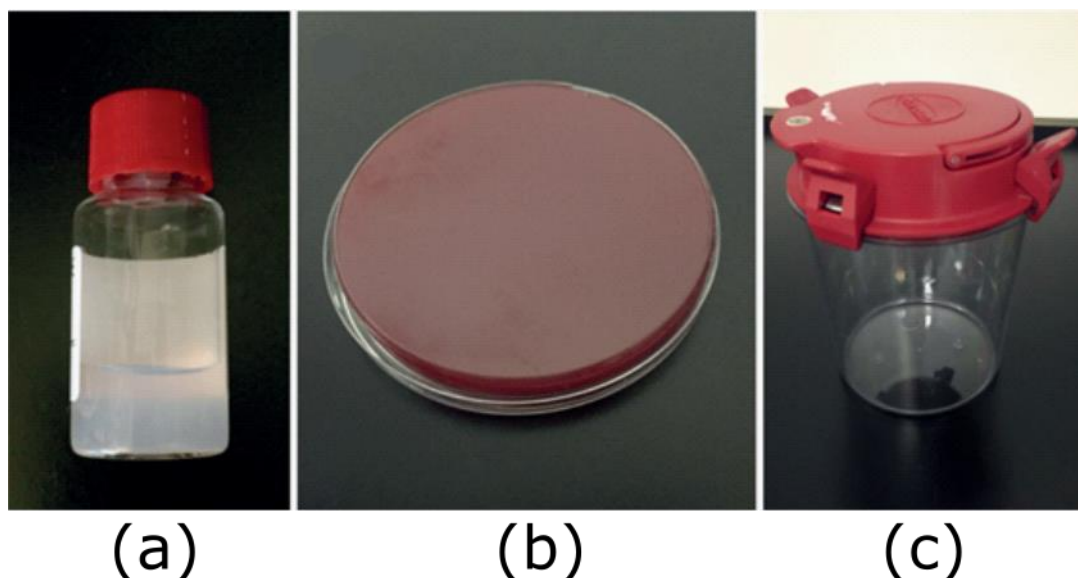


Figura 4 - Material de colheita, transporte e incubação de amostras biológicas em anaerobioses: (A) meio de colheita e transporte de amostras para pesquisa de anaeróbios; (B) meio de cultura - gelose sangue específico para crescimento de anaeróbios fastidiosos, (C) jarra de anaerobiose para acondicionamento, em atmosfera anaeróbica controlada, das placas inoculadas.

Para a manutenção da atmosfera de anaerobiose, foram desenvolvidos vários sistemas, tais como: jarras (Figura 4 C), caixas, sacos e câmaras de anaerobiose. De entre estes, a jarra é a mais utilizada. Esta pode ser confeccionada de plástico ou vidro com tampa hermética, que permite criar uma atmosfera de anaerobiose através de vários métodos. Num dos métodos, o mais fácil, usa-se um envelope gerador de dióxido de carbono e hidrogénio (GasPak) que é colocado na jarra juntamente com as placas de cultura. O gerador é ativado com a água, e o oxigénio existente dentro da jarra juntamente com o hidrogénio que é gerado são convertidos em água na presença de um catalisador (normalmente paládio revestido com partículas de alumínio), produzindo assim condições anaeróbicas (Hentges, 1996; Lagier *et al.*, 2015). O dióxido de carbono, que também é gerado, é necessário para o crescimento de alguns anaeróbios e estimula o crescimento de outros. Uma outra estratégia para gerar ambiente anaerobiose, utilizando a jarra consiste na remoção e substituição do ar. O ar é removido da jarra selada contendo as placas de cultura e é substituído por uma mistura livre de oxigênio, constituída por 80% de nitrogênio, 10% de hidrogênio e 10% de dióxido de carbono (Hentges, 1996). As jarras anaeróbicas apesar de serem as mais utilizadas só permitem uma atmosfera anaeróbia durante a incubação, sendo o seu uso não adequado para

isolamento das bactérias anaeróbias obrigatórias. Estas podem ser recuperadas com sucesso utilizando uma câmara de anaerobiose (Lagier *et al.*, 2015).

A câmara de anaerobiose é câmara de vinilo transparente fechada (como se fosse uma câmara de fluxo laminar) com luvas anexadas e estufa de incubação, contendo no seu interior uma mistura de 80% de nitrogénio, 10% de hidrogénio e 10% de dióxido de carbono. Esta contém um bloqueio numa extremidade equipado com duas escotilhas, uma que conduz ao exterior e a outra ao interior da câmara. As amostras são colocadas no bloqueio, a escotilha externa é fechada e o ar na fechadura é removido e substituído pela mistura de gás. A escotilha interior é então aberta para introduzir a amostra na câmara sem haver a entrada do oxigénio. Procedimentos bacteriológicos convencionais são utilizados para processar as amostras na atmosfera livre de oxigénio, permitindo o processamento de um grande número de amostras e a recuperação de todas as bactérias anaeróbias inclusive as estritas, como por exemplo o *Clostridium difficile* (Hentges, 1996; Lagier *et al.*, 2015). Embora sistemas como este sejam necessários para isolar componentes de flora anaeróbica, estudos demonstraram que as jarras de anaerobioses são adequadas para recuperar anaeróbios clinicamente significativos, porque, na maioria, as bactérias da microflora extremamente sensíveis ao oxigénio não estão associadas a processos infecciosos (Hentges, 1996).

A identificação dos micro-organismos é um processo crucial no diagnóstico bacteriológico. Antes de aplicar qualquer método de identificação de um organismo anaeróbico, é muito importante garantir que a cultura em questão seja pura, pois esta deve estar livre de contaminantes aeróbicos e anaeróbicos. No entanto, é pertinente mencionar que sempre que as subculturas são feitas a partir de uma cultura supostamente pura de um anaeróbio, deve-se inocular em paralelo uma placa de controle aeróbio e esta deve permanecer estéril (Willis, 1977).

A identificação convencional é baseada nas características fenotípicas como exame microscópico pela coloração de Gram, morfologia das colónias, crescimento em meio seletivo e uma variedade de testes bioquímicos (Dowell & Hawkins, 1974; Willis, 1977; Chemother, 2011). As características bioquímicas para a identificação das bactérias anaeróbias, podem compreender a fermentação de carboidratos, redução dos nitritos, produção do indol, solubilidade em bÍlis, digestão da cisteína, teste de catalase, lipase,

hidrólise da esculina, amido e ácidos gordos voláteis (determinado por cromatografia gasosa) (Dowell & Hawkins, 1974; Pfaller *et al.*, 2015). Estas características e outras não mencionadas podem ser identificadas utilizando métodos semiautomáticos e automáticos. Existem vários *kits* e equipamentos para identificação dos anaeróbios clinicamente significativos, (e.g., *RapID-ANA II panel*, o *Minitek systems*, o *Vitek ANI card*, o *BBL Crystal ANR*, o *API rapid ID 32 A system* e o *API 20 A system*) e são normalmente métodos de identificação simples, rápidos e satisfatórios (Lee *et al.*, 2011).

Para além destes testes, o teste de inibição quimioterápicos é também uma ajuda valiosa na identificação dos anaeróbios por métodos convencionais. Este teste consiste em inocular uma placa de Columbia enriquecido com vitamina K e hemina, com a bactéria a estudar e colocar os três discos de antibióticos de potência específica, Vancomicina (5 µg), Kanamicina (1000 µg) e Colistina (10 µg), sendo considerado suscetibilidade a presença de halos de tamanhos  $\geq 10$  mm. Este teste é útil na identificação presuntiva de muitos anaeróbios de Gram-negativos. Os bacilos anaeróbios de Gram-negativos são tipicamente resistentes à Vancomicina, sendo as espécies pigmentadas de *Porphyromonas* e *S. amnii* as únicas exceções. A suscetibilidade tanto à Kanamicina como à Colistina é característica das espécies de *Fusobacterium* e *Leptotrichia* e *S. wadsworthensis* (Pfaller *et al.*, 2015).

A identificação precisa para alguns anaeróbios é difícil, mesmo que os nomes das espécies sejam sugeridos com alta probabilidade usando kits de identificação. No processo da identificação, o exame microscópico da coloração de Gram, o exame macroscópico das colónias e a possibilidade de crescimento nos meios de confirmação são mais relevantes do que os resultados obtidos com os kits de identificação. Para alguns anaeróbios, a identificação é limitada ao género (Chemother, 2011).

Estudos sugerem que um número significativo de anaeróbios patogénicos clinicamente importantes não são detetados ou permanecem mal caracterizados devido às insuficiências das técnicas bacteriológicas anaeróbicas convencionais e testes fenotípicos em particular. Cerca de 50 – 75% dos anaeróbios isolados são caracterizados de forma satisfatória e cerca de 27% dos laboratórios nunca identificam anaeróbios devido à complexidade dos métodos convencionais de identificação, à falta de

capacidade em fornecer resultados confiáveis e ao elevado custo associado ao diagnóstico destas bactérias (Song, 2005). Os métodos tradicionais têm vantagens inerentes, mas têm deficiências nomeadamente, a necessidade de preservar a vitalidade bacteriana, a incapacidade para detetar um baixo número de micro-organismos (limite de deteção, em média, de  $10^3$  a  $10^4$ ), são laboriosos, necessitam de pessoal experiente para a sua realização e de condições de transporte específicas e o resultado demora a ser obtido (Maheaswari *et al.*, 2016). Portanto, a necessidade de um método de diagnóstico rápido e preciso para a identificação de agentes anaeróbios patogénicos é altamente desejável, pois possibilita uma intervenção precoce e efetiva, permitindo uma evolução importante no diagnóstico destas infeções e consequentemente o tratamento adequado. Os métodos moleculares surgiram como alternativa para auxiliar na identificação de bactérias anaeróbias (Song, 2005). Vários estudos revelam que são métodos rápidos e, devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, permitem uma deteção, identificação e quantificação eficiente de organismos anaeróbios (Maheaswari *et al.*, 2016).

### **1.5.2. Identificação por métodos moleculares**

Os métodos moleculares tornaram-se ferramentas importantes para a identificação de micro-organismos pela sua alta especificidade e sensibilidade (Knight, 2000). Várias metodologias já foram usadas na identificação molecular de bactérias mas elas agrupam-se essencialmente em técnicas de hibridação do DNA ou RNA e amplificação do DNA por PCR (Towner & Cockayne, 1993; Knight, 2000).

Técnicas de hibridação foram introduzidas na caracterização de micro-organismos nos anos 60 (Rosenberg *et al.*, 2013). A hibridação é um processo baseado na capacidade dos ácidos nucleicos simples de emparelhar com sua cadeia complementar através da formação de pontes de hidrogénio. O ácido nucleico que é emparelhado, designado por sonda, é normalmente marcado com nucleótidos radioativos o que permitirá a sua posterior visualização, podendo a sua especificidade ao alvo ser controlada de várias maneiras em condições de laboratório através de variações da temperatura, concentração de sais, pH e características da própria sonda. As sondas não hibridizadas são removidas por lavagens consecutivas. Entre as vantagens das técnicas de hibridação incluem-se a sua reprodutibilidade e simplicidade dos resultados, a sua aplicabilidade a um vasto grupo de micro-organismos e a disponibilidade de sondas universais (Towner

& Cockayne, 1993). No entanto, continua a ser uma técnica demorada, com uma metodologia complexa permitindo, apenas, informações sobre a região hibridizada (Rosselló-Mora, 2006). A técnica de hibridação continua a ser uma técnica padrão na identificação e descrição de novas espécies de bactérias, sendo extremamente útil quando um novo grupo taxonómico contém várias estirpes e principalmente quando estas possuem mais de 97% de similaridade do rRNA 16S (Tindall *et al.*, 2010). Valores de hibridação superior a 70% são considerados como limite para a definição de espécies (Towner & Cockayne, 1993).

A identificação de bactérias através da amplificação do material genético tornou-se possível logo após a publicação da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) por Saiki *et al.* (1985). Esta técnica enzimática amplifica exponencialmente uma sequência específica do DNA que é flanqueado por duas sequências complementares, os *primers*.

Genes ribossomais, constituem os principais alvos usados na identificação de micro-organismos, mais especificamente o rRNA 16S é normalmente reconhecido como uma ferramenta filogenética por várias razões (Towner & Cockayne, 1993; Patel, 2001; Harayama & Kasai, 2006). Primeiro, porque está presente em todas as espécies de bactérias até agora reconhecidas. Além disso, esta região genómica é funcionalmente conservada (Patel, 2001). Finalmente, o rRNA 16S é estruturalmente dividido em vários domínios e, portanto, a acumulação de mutações é independente entre eles e a velocidade em que isso acontece é também variável.

A técnica clássica de PCR já foi usada na identificação de várias espécies de bactérias. Para este efeito, é necessário obter *primers* específicos para a espécie-alvo, amplificar o material genético e visualizá-lo num gel apropriado ( Figura 5). (Towner & Cockayne, 1993).





Figura 5 - Principais passos para a análise do rRNA 16S na identificação de bactérias em amostras clínicas. Adaptado de Patel (2001).

Para que se dê uma reação de PCR são necessários essencialmente: (i) uma cadeia dupla de DNA (dsDNA molde), (ii) um par de *primers* (os oligonucleótidos iniciadores da reação) que sejam homólogos às regiões que flanqueiam o que se pretende amplificar, (iii) nucleótidos, e (iv) uma enzima para a síntese do DNA (usualmente a *Taq* polimerase) (Desforges & Eisenstein, 1990; Maheaswari *et al.*, 2016). Esta enzima deve o seu nome ao facto de ter sido isolada de uma bactéria aquática – *Thermus aquaticus* que vive a altas temperatura, por isso consegue suportar a temperatura que é necessária durante os ciclos de PCR, para desnaturar o DNA. Os *primers* são sintetizados de forma a serem complementares às extremidades 3' do fragmento do DNA alvo (Desforges & Eisenstein, 1990).

A reação de PCR é constituída por vários ciclos que decorrem a diferentes temperaturas. Cada ciclo tem uma fase de desnaturação, uma de emparelhamento dos *primers* e, finalmente uma de extensão onde ocorre a síntese do DNA. Para que esta técnica possa ser executada em perfeitas condições é usado um aparelho (termociclador) constituído por blocos de resistência elétrica que distribui homogeneamente a temperatura, durante todo o processo. Na PCR a desnaturação é conseguida com a incubação do DNA a 95°C, para que as cadeias se separem. Segue-se o emparelhamento dos *primers* (hibridação) o que requer uma diminuição gradual de temperatura para valores entre 55 e 60°C, dependendo do conteúdo em G e C dos primers. Nesta fase do processo as cadeias de DNA permanecem afastadas, pois estão em baixas concentrações e a probabilidade de se encontrarem na mistura da reação é baixa. Ao contrario, os *primers* que estão em concentrações altas, vão conseguir encontrar as cadeias de DNA para com elas emparelharem. Para que ocorra a síntese de DNA por ação da *Taq* polimerase, a temperatura é elevada aos 72°C; dando-se assim o alongamento do DNA tendo como molde a cadeia de DNA à qual o *primer* está ligado. Cada ciclo composto, por estas três



fases, é repetido varias vezes sem que seja necessário a intervenção de um operador (Figura 6) (Maheaswari *et al.*, 2016).

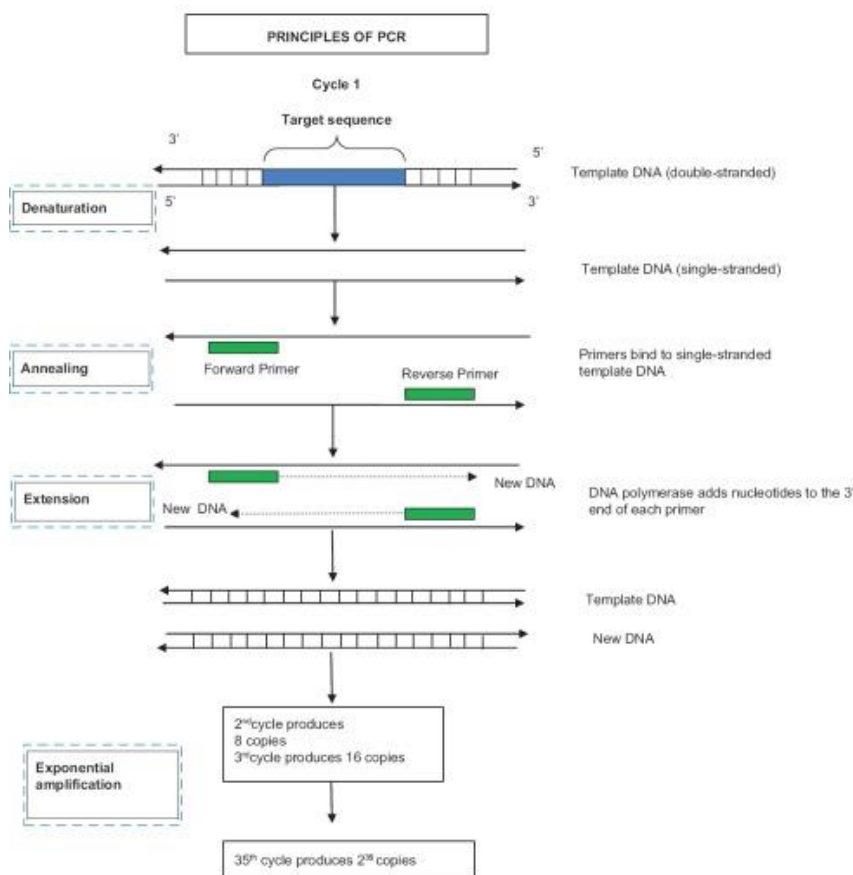


Figura 6 A reação ocorre num termociclador e cada ciclo é constituído por 3 etapas: (1) desnaturação do dsDNA em duas cadeias simples, realizada a 95°C; (2) hibridação dos *primers* nas sequências alvo, a uma temperatura de 50-60°C; (3). Extensão da sequência de DNA molde – a enzima Taq polimerase sintetiza novas cadeias complementares pela extensão de DNA a 72°C gerando cópias do DNA molde. No fim de cada ciclo, o DNA sintetizado serve como molde para o próximo ciclo. Adaptado de Maheaswari et al. (2016).

Normalmente, o produto amplificado é visualizado através de eletroforese em gel de agarose no qual é incorporado um corante (e.g. brometo de etídio, *greensafe*) que se intercala na cadeia dupla de DNA e na presença de luz U.V, emite uma banda fluorescente visível a olho nu. Os produtos aparecem como uma banda única correspondente ao tamanho da sequência amplificada. (Towner & Cockayne, 1993; Maheaswari *et al.*, 2016).

A maior sensibilidade, precisão, reprodutibilidade, facilidade de quantificação, rapidez na obtenção de resultados são as principais vantagens da PCR. Como a viabilidade celular não é um impedimento para a técnica de PCR, é vantajosa a sua utilização no estudo de infecções estritamente anaeróbicas, nas quais a morte celular pode ocorrer durante processamento das amostras (Maheaswari *et al.*, 2016).

A PCR no diagnóstico de infecções clínicas por bactérias apresenta enumeras vantagens quando comparada com os métodos tradicionais de identificação, no entanto, deve ser vista como uma metodologia complementar para ser utilizada em situações específicas, sendo que a sua relação custo-eficácia ainda não permite a sua aplicação rotineira em muitos diagnósticos microbiológicos (Maheaswari *et al.*, 2016).

Um dos problemas associados ao PCR é o facto de a enzima *Taq* polimerase não ter a capacidade de corrigir os erros (atividade de exonuclease 3'→5'), contrariamente às outras DNA polimerases. Assim à medida que a cadeia de DNA é sintetizado, é provável que erros sejam incorporados na cadeia (Valasek, 2005). Um outro inconveniente decorre da elevada sensibilidade da técnica, que, como tal, é também mais suscetível a contaminações. (Maheaswari *et al.*, 2016)

As principais desvantagens da aplicação de PCR no contexto clínico incluem resultados falso-positivos por contaminações com DNA exógeno, resultados falsos negativos por incorreção na pipetagem do volume da amostra, elevada sensibilidade de deteção sem significado clínico (Yang & Rothman, 2004).

Apesar de algumas limitações, a PCR é a técnica molecular mais bem desenvolvida até agora, e tem uma ampla gama de aplicações clínicas, incluindo deteção de patógenos específicos ou de amplo espectro, vigilância, deteção precoce de agentes infecciosos e perfil de resistência antimicrobiana (Yang & Rothman, 2004).

A PCR pode ser qualitativa, semi-quantitativa ou quantitativa. Um avanço significativo na tecnologia de PCR é o PCR em tempo real (PCRtr), que contrariamente à técnica clássica é bastante mais rápida. Esta técnica realiza em simultâneo a amplificação do material genético, o processo de deteção e quantificação da fluorescência (Espy *et al.*, 2006; QIAGEN, 2010) emitida por fluoróforos, normalmente ligados à sonda (Figura 7). Esta fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de DNA amplificado.

Para fins de aplicabilidade clínica, a técnica representa um grande avanço, dada a sua elevada sensibilidade, especificidade e rapidez, eliminando a necessidade do processamento pós-amplificação, isto é, a realização da eletroforese em gel de agarose. É de salientar ainda, outras vantagens da técnica de PCR em tempo real em relação a PCR convencional, a simplicidade, a reprodutibilidade e a precisão quantitativa (Yang & Rothman, 2004).

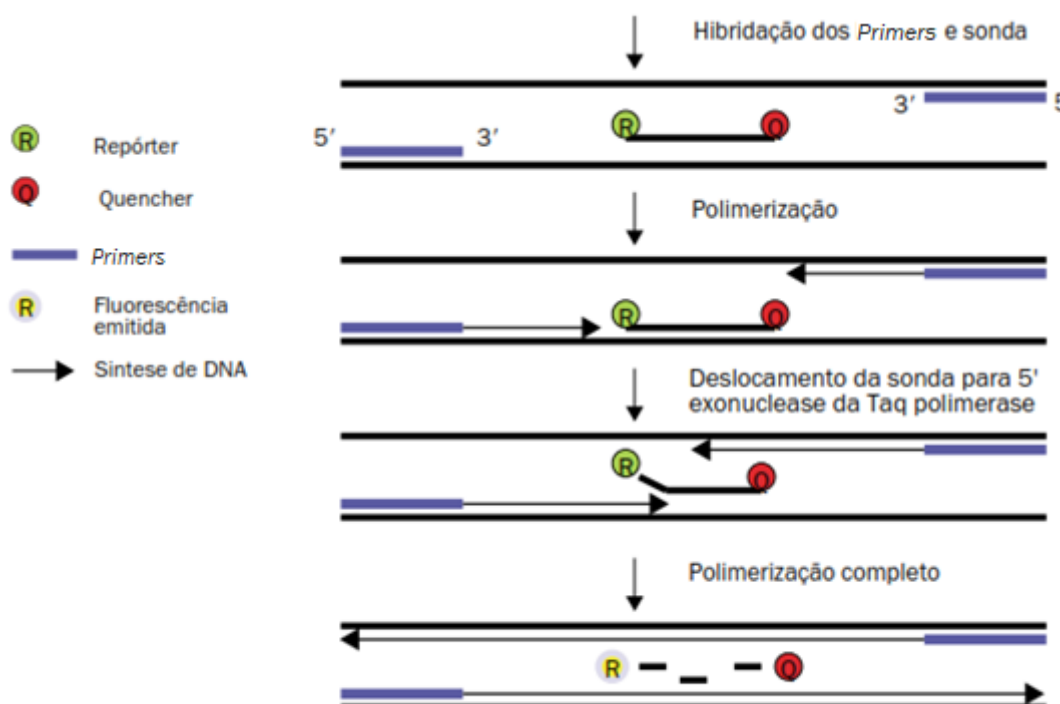


Figura 7 - PCRtr utilizando sonda TaqMan. As sondas TaqMan são oligonucleótidos de cadeia simples marcados com 2 fluoróforos diferentes, na extremidade 5' encontra-se um emissor (*reporter*) e na extremidade 3' o recetor (*quencher*). A sequência da sonda é homóloga a uma sequência alvo interna no fragmento que se pretende amplificar por PCR. Quando a sonda está intacta, a fluorescência emitida pelo *repórter* é absorvida pelo *quencher*. Durante a extensão, a sonda é clivada devido à atividade 5'-exonuclease da *Taq* polimerase, separando-se o *reporter* do *quencher*, o que permite a deteção da fluorescência emitida pelo *reporter*. À medida que a amplificação prossegue, o aumento da fluorescência é proporcional à quantidade de produto amplificado. Adaptado de Yang & Rothman (2004).

## 1.6. Tratamento de infeções causadas por bactérias anaeróbias

O procedimento adequado para tratamento eficaz contra as bactérias anaeróbias, inclui em muito dos casos, para além da administração antimicrobiana adequada, a drenagem

e/ou desbridamento dos tecidos necróticos, ou mesmo excisão cirúrgica (Finegold & Wexler, 1996c; Brook, 2002; Brook, 2008). Tal como acontece com a maioria dos abscessos, a drenagem do material purulento é o principal tratamento, em associação com a antibioterapia apropriada, dado que os antibióticos por si só podem ser ineficazes devido à incapacidade de penetrar no local da infeção (Rayan & Ray, 2004).

A seleção dos antimicrobianos utilizados no tratamento inicial é necessariamente empírica, isto porque pode demorar vários dias até serem obtidas informações definitivas sobre o(s) micro-organismo(s) envolvido(s) no processo infeccioso. Estas infeções são geralmente mistas o que dificulta, ainda mais, o diagnóstico laboratorial e o seu tratamento. Por este motivo, é necessário que os médicos tratem as infeções anaeróbicas empiricamente até que os dados laboratoriais estejam disponíveis. Esse tratamento deve basear-se no conhecimento da natureza do processo infeccioso, dos micro-organismos usualmente encontrados neste tipo de infeção e dos seus padrões de suscetibilidade habituais (Finegold, 1997; Rayan & Ray, 2004). Na escolha dos agentes antimicrobianos devem ser considerados um conjunto de requisitos: eficácia contra todos os organismos alvo, atingir níveis suficientes no local infetado, ter um nível de toxicidade não prejudicial ao organismo e dispor de máxima estabilidade e longevidade. A natureza dos vários organismos numa infeção mista, também influenciará a escolha dos medicamentos, pois os medicamentos ativos contra bactérias anaeróbicas podem ser inativos contra os organismos aeróbicos ou facultativos que os acompanham. Portanto, perante as infeções que envolvem micro-organismos desta natureza, pode ser necessário a administração de dois ou mais medicamentos para fornecer uma cobertura efetiva para cada um dos agentes presentes na infeção (Brook, 2008).

Os antibióticos ou grupos de antibióticos ativos contra a maioria das bactérias anaeróbicas clinicamente importantes, incluem nitroimidazoles, tais como, o metronidazol, carbapenem, nomeadamente, o imipenem, cloranfenicol e combinações de fármacos  $\beta$ -lactâmicos com um inibidor de  $\beta$ -lactamase (e.g., ácido clavulânico) (Finegold & Wexler, 1996c; Brook, 2002). Clindamicina e as cefalosporinas de amplo espectro são também frequentemente adicionadas ao regime terapêutico (Rayan & Ray, 2004). A terapêutica adequada com antibiótico geralmente demora 5 a 7 dias, nalgumas situações recomenda-se um periodo mais longo, de até 14 dias (Brook, 2002).

Estudos documentaram um aumento da resistência aos antibióticos tradicionais utilizados no tratamento das bactérias anaeróbias. O uso totalmente empírico de fármacos altamente potentes para tratar infecções mistas envolvendo anaeróbios, conduz a uma maior resistência a estes fármacos. O impacto das tendências de resistências associadas a falhas clínicas, resultou em mudanças recentes nas recomendações para o tratamento empírico de algumas infecções envolvendo estes agentes. Em casos de infecções intra-abdominais, tanto a cefoxitina como o cefotetano, não são recomendados como terapêuticas de primeira linha e, a clindamicina deixou de pertencer à lista dos fármacos de primeira linha. Infelizmente, um aumento constante da resistência contra estes medicamentos pode ser observado entre diferentes espécies anaeróbicas, principalmente espécies de *Bacteroides* (Nagy, 2010). Das espécies do grupo *B. fragilis*, 15% - 25% são resistentes a este fármaco. Este grupo, que no início dos anos 80 apresentava uma resistência de 6% à clindamicina, aumentou em 2004 a percentagem para 32% (Snydman *et al.*, 2010). As taxas de resistência aos carbapenems e nitroimidazoles em geral, permaneceram baixas, assim como, os níveis de resistência encontrados nos géneros *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e, possivelmente, numa escala menor, também em *Prevotella* e *Peptostreptococci* (Nagy, 2010).

Contudo, é de salientar que esta crescente resistência aos antibióticos é em boa parte devida à instituição da terapêutica empírica, pois a escolha final do antibiótico dependerá da cultura e dos testes de sensibilidade (Brook, 2002). A realização do teste sensibilidade aos antibióticos (TSA) em todos os isolados anaeróbios não é, inclusivamente, recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Liu *et al.*, 2008). Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, são recomendados em circunstâncias precisas, tais como, infecção grave potencialmente fatal, resistência/recaída após antibioterapia empírica, dados incertos sobre o perfil de suscetibilidade do agente isolado, necessidade de antibioterapia prolongada ou reconhecido perfil de resistência (incidência crescente do grupo *B. fragilis* produtores de  $\beta$ -lactamases, agente particularmente virulento). De entre os organismos anaeróbios que obrigatoriamente devem ser selecionados para o teste de suscetibilidade incluem-se os organismos com variabilidade conhecida nos padrões de suscetibilidade, por exemplo, o grupo *B. fragilis*. Outros bacilos Gram-negativos anaeróbicos (*Prevotella* spp, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum/varium*), *C. perfringens* e

outras espécies de *Clostridium*, tais como, *C. ramosum*, *C. innuocuum* e *C. clostridioforme* porque são organismos cujos padrões de suscetibilidade não estão bem conhecidos e serem especialmente virulentos (Finegold & Wexler, 1996b; Brook, 2008). Os antibióticos testados devem incluir uma penicilina de amplo espectro,  $\beta$ -lactâmicos com inibidores da  $\beta$ -lactamases, imipenem, metronidazol, clindamicina e cloranfenicol (Brook, 2008).

## 1.7. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é otimizar e estabelecer protocolos de PCRtr que permitam a rápida e correta identificação dos principais géneros de bactérias anaeróbios clinicamente significativos, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium* em amostras clínicas.

Como objetivos específicos pretendeu-se:

- i. Otimizar o protocolo de extração do DNA a partir de líquidos biológicos e exsudados purulentos
- ii. Otimizar o protocolo de PCRtr para a deteção de *Clostridium*
- iii. Determinar a eficiência, sensibilidade e a especificidade dos protocolos otimizados;
- iv. Aplicar protocolos de PCRtr a amostras biológicas para a deteção de espécies dos géneros *Bacterioides*, *Prevotella* e *Clostridium*;
- v. Comparar os resultados obtidos pelo método de cultura com os de biologia molecular.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostras - recolha, transporte e armazenamento

Para a realização deste estudo, foram recolhidas 175 amostras biológicas enviadas para exame bacteriológico por suspeita de infeção por bactérias anaeróbias. Estas amostras, foram obtidas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz (LMBM/HEM) do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental (CHLO). As amostras foram colhidas para meio de transporte para anaeróbios (*Portagerm Amies Agar*, bioMérieux), entre Outubro de 2016 e Maio de 2017, em três hospitais (HEM, Hospital São Francisco Xavier [HSFX] e Hospital de Santa Cruz [HSC]), pertencentes ao CHLO.

As amostras foram armazenadas a 4°C no Laboratório HEM, durante uma semana ou até a conclusão do exame bacteriológico, e transportadas em recipientes refrigerados para o Laboratório de Microbiologia da NOVA Medical School | Faculdade de Ciências Médicas (LMNMS|FCM), onde ficaram armazenadas a -80°C até serem processadas. Das 175 amostras recebidas só 158 apresentavam volume igual ou superior a 200 µl, pelo que, apenas estas, foram consideradas no presente estudo.

### 2.2. Processamento das amostras

Todas as amostras analisadas foram previamente processadas no LMBM/HEM para pesquisa de bactérias anaeróbias por cultura, de acordo com o Procedimento Técnico – Cultura e Identificação das bactérias anaeróbias (Anexo 1).

#### 2.2.1. Extração do DNA das amostras

##### 2.2.1.1. Otimização de protocolos

Na otimização do protocolo de extração de DNA, a partir de amostras biológicas, avaliou-se a eficiência de três kits comerciais, *PureLink Genomic DNA Mini Kit*, Invitrogen; *QIAamp® DNA Stool Mini Kit*, QIAGEN e *QIAamp® DNA Mini Kit*, QIAGEN, cujos protocolos originais são apresentados no Anexo 2. No presente trabalho, durante processo de otimização dos protocolos de extração do DNA

realizaram-se algumas adaptações e/ou alterações pontuais, algumas foram realizadas só num protocolo outras foram nos três protocolos.

O *PureLink Genomic DNA Mini Kit* foi utilizado para a extração do DNA a partir de amostras líquidas. Foram testados dois protocolos de lise, um para as bactérias de Gram negativo e outro para as de Gram positivo. Este teste foi necessário, pois o próprio fabricante propõe protocolos ligeiramente diferentes para a extração do DNA a partir destas duas categorias de bactérias. Os protocolos realizados eram recomendados para culturas puras de bactérias e neste estudo adaptaram-se para extração de DNA a partir de líquidos biológicos. Uma das alterações feita ao protocolo foi adição de um segundo passo de centrifugação após a lavagem com o último tampão. Fez-se esse passo para minimizar a possibilidade de *carry-over* com esta solução.

O *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN) e o *QIAamp® DNA Mini Kit* (QIAGEN) foram utilizados para a extração de DNA a partir de amostras purulentas. Os protocolos utilizados em cada um dos kits, *Isolation of DNA from Stool for pathogen Detection* e o *DNA purification from tissues*, respetivamente, foram alterados. Estas alterações foram incluídas porque os protocolos estavam otimizados para extrações de DNA a partir de amostras de fezes e tecidos, respetivamente e, neste estudo adaptaram-se para a extração de DNA a partir de amostras purulentas.

No protocolo, *Isolation of DNA from Stool for pathogen Detection*, o tempo e a temperatura de incubação na fase de lise das amostras foram alterados, isto é, alterou-se a incubação com o tampão de lise ASL de 5 minutos a 70°C para 10 minutos a 95°C e a incubação com a proteinase K e o tampão AL de 10 minutos a 70°C para uma hora a 70°C.

Outras alterações introduzidas foram o pipetar diretamente a proteinase K no tubo onde se efetuou a lise e duplicar o tempo de agitação em alguns passos

Das alterações feitas nos três protocolos de extração salienta-se o aumento do tempo de centrifugação. Assim, nos pontos referentes às lavagens, em vez de se centrifugar os tubos durante um minuto, centrifugou-se durante o dobro do tempo e, logo antes da eluição do DNA, em vez de se centrifugar durante um minuto ou um minuto e meio, centrifugou-se durante três minutos.



Uma outra alteração foi na eluição do DNA, o fabricante recomendava a eluição do DNA em 200µL da solução e a incubação durante um minuto para ressuspender o DNA. No presente trabalho optou-se por eluir o DNA em 50µL e incubar durante cinco minutos.

Adicionalmente, no sentido de tentar maximizar o rendimento do processo, foi ainda incluída no protocolo *Isolation of DNA from Stool for pathogen Detection*, uma segunda eluição, embora as instruções do fabricante não referissem a essa necessidade. Por outras palavras, o processo da eluição foi repetido, tendo especial atenção em recolher e utilizar o eluato já eluído no passo anterior.

#### 2.2.1.2. Protocolos de extração otimizados

Após a otimização dos protocolos, procedeu-se a extração do DNA a partir das amostras, utilizando o *PureLink Genomic DNA Mini Kit* para as amostras líquidas e o *QIAamp DNA Stool Mini Kit* para as amostras purulentas.

##### Protocolo otimizado para extração de DNA a partir de líquidos biológicos

Para extração de DNA genómico de bactérias a partir de líquidos biológicos, tais como bñlis, líquidos sinoviais, pericárdicos e todas as amostras que apesar das denominações, apresentavam um aspeto líquido, foi utilizado o kit comercial *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante para lise das bactérias de Gram positivo com pequenas alterações realçadas a negrito:

1. Preparar o tampão de digestão com lisozima (20mg/mL): adicionar 20mg de Lisozima a 1mL de tampão de digestão.
2. Agitar fortemente no agitador *vortex* e fazer *spin*.
3. Adicionar 180µL de tampão de digestão Genomic PureLink com lisozima a 200µL da amostra e agitar no agitador *vortex*.
4. Incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Adicionar 20µL de Proteinase K (20mg/mL). Agitar no agitador *vortex*.
6. Adicionar 200µL de Genómica PureLink® / Binding Buffer. Misturar bem no agitador *Vortex*.

7. Incubar a 55°C durante 30 minutos.
8. Adicionar 200µL de etanol absoluto (96-100%). Homogeneizar bem no agitador *vortex* durante 5 segundos ou até obter uma solução homogênea.
7. Preparar a coluna.
8. Transferir o lisado ( $\approx$  640µL) para a coluna.
9. Centrifugar a coluna a 10 000g durante **2 minutos** à temperatura ambiente.
10. Descartar o tubo de recolha. Colocar a coluna num novo tubo de recolha.
11. Adicionar 500µL de tampão de lavagem 1.
12. Centrifugar a 10 000g durante **2 minutos** à temperatura ambiente.
13. Descarte o tubo de recolha. Colocar a coluna num novo tubo de recolha.
14. Adicionar 500µL de tampão de lavagem 2.
15. Centrifugar à velocidade máxima durante 3 minutos à temperatura ambiente. Descartar o tubo de recolha.
16. **Colocar a coluna num novo tubo de recolha e centrifugar a coluna vazia a 10 000g, de modo a diminuir a possibilidade de *carry-over* da solução de lavagem AW2.**
17. Colocar a coluna num *ependorf* estéril de 1,5mL estéril.
18. Adicionar 50µL de *Elution Buffer*.
19. Incubar 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugar a coluna à velocidade máxima durante **2 minutos** à temperatura ambiente (T.A.).
20. Efetuar uma segunda eluição com os 50µL do eluato do passo anterior.
21. Centrifugue à velocidade máxima durante 3 minutos. Remover e descartar a coluna.
22. Armazenar o DNA a -20°C.

Protocolo otimizado para extração de DNA a partir de exsudados purulentas

Para extração de DNA das amostras purulentas, como exsudados profundos, amostras de feridas cirúrgicas, pus de abscessos e todas as amostras que independentemente da denominação apresentavam um aspeto purulento, foi utilizado o kit comercial *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN), seguindo o protocolo *Isolation of DNA from Stool for pathogen Detection* com algumas adaptações e modificações nos pontos que foram alvo de otimização (assinaladas a negrito):

1. Adicionar 400µL de tampão de lise ASL a 200µL de amostra congelada.
2. Agitar fortemente no *vortex* durante 30 segundos ou até as amostras estarem completamente homogeneizadas. **Fazer spin.**
3. Incubar **10 minutos a 95°C.**
4. Agitar fortemente no *vortex* **30 segundos.** Fazer um *spin*.
5. Adicionar **diretamente** 15µL de proteinase K e 200µL de tampão AL. Agitar vigorosamente no *vortex* **30 segundos.**
6. Incubar **uma hora** a 70°C. **Fazer spin.**
7. Adicionar 200µL de etanol absoluto (96-100%) e agitar fortemente no *vortex* 15 segundos. Fazer *spin*.
8. Colocar toda a suspensão na coluna preparada com o tubo de recolha.
9. Centrifugar 2 minutos a 17 000g.
10. Colocar a coluna num novo tubo de recolha e adicionar 500µL de solução de lavagem AW1.
11. Centrifugar 2 minutos a 17 000g.
12. Colocar a coluna num novo tubo de recolha e adicionar 500µL de solução de lavagem AW2.
13. Centrifugar 3 minutos a 17 000g.

14. Colocar um novo tubo de recolha e centrifugar a coluna vazia 1 minuto a 17 000g, de modo a diminuir a possibilidade de *carry-over* da solução de lavagem AW2.
15. Colocar a coluna num tubo de 1,5mL esterilizado e adicionar **50 µL tampão AE previamente aquecido a 70°C**.
16. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente para a membrana de sílica absorver o tampão.
17. **Efetuar uma segunda eluição com os 50µL do eluato do passo anterior (pré-aquecido a 70°C).**
18. **Incubar 5 minutos à temperatura ambiente.**
19. Centrifugar **3 minutos** a 16 000g.
20. Armazenar o DNA eluído a -20°C.

#### Extração de DNA a partir de cultura pura

Além destes dois protocolos, neste estudo, utilizou-se ainda o *kit InstaGene™ Matrix* (Bio-Rad) para obtenção de DNA alvo utilizados como controlos positivos da reação de PCRtr e para estudo da especificidade e sensibilidade analítica dos *primers* e sondas. A extração executou-se a partir de culturas puras em meio de gelose sangue, seguindo as instruções do fabricante, com pequenas modificações realçadas a negrito:

1. Recolher **algumas colónias** com a ansa de **10µL** e ressuspender em **500µL** de água estéril.
2. Agitar no *vortex*.
3. Centrifugar 1 minuto a 12 000 rpm;
4. Decantar sobrenadante.
5. Agitar bem o reagente (InstaGene Matrix) e adicionar **100µL** ao pellet.
6. Agitar no *vortex*.
7. Incubar a 56°C durante 20 minutos no termobloco.

8. Agitar 10 segundos no *vortex* à velocidade máxima.
9. Incubar a 100°C durante 8 minutos no termobloco.
10. Agitar 10 segundos no *vortex* à velocidade máxima.
11. Centrifugar 3 minutos a 12 000 rpm.
12. Recolher o sobrenadante.
13. Efectuar a leitura da densidade óptica (DO) de uma diluição do DNA a 206 nm e 280 nm. A concentração foi determinada pela seguinte formula:  $D.O_{260nm} \times 2,55 = \mu g/mL$  e a sua pureza de acordo com:  $D.O_{260}/D.O_{280} \geq 1,8$
14. Etiquetar e armazenar os extratos a -20°C.

## 2.3. Protocolo de PCR em tempo real

### 2.3.1. Seleção dos *primers* e sondas

Os *primers* e sondas para gene 16S rRNA dos dois géneros de bactérias anaeróbias, *Bacteroides*, e *Prevotella*, utilizados no presente trabalho, foram seleccionados num estudo anterior (Carvalho, 2016). Enquanto que, a seleção dos *primers* e sonda para o género *Clostridium* foi feita após revisão bibliográfica.

Tabela 7 - Sequências de *primers* e sondas utilizadas para identificação dos géneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium*. Legenda: H=A, C ou T; R=A ou G (IUPAC).

Nome	Sequência (5'→3')	Tamanho fragmento	Referencias
<i>Bacteroides</i>			
BactsppF	GGGTTTAAAGGGAGCGTAGG	116pb	(Layton <i>et al.</i> , 2006)
BactsppR	CTACACCACGAATTCCGCCT		
SondaBact	(FAM)TAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGCGCTC(BHQ-1)		
<i>Prevotella</i>			
PrevspF	ACCAGCCAAGTAGCGTGCA	153pb	(Martin <i>et al.</i> , 2002)
PrevspR	TGGACCTTCCGTATTACCGC		
SondaPrev	(FAM)AATAAGGACCGGCTAATTCCGTGCCAG(BHQ1)		
<i>Clostridium</i>			
ClosCI-F	TACCHRAGGAGGAAGCCAC	232pb	(Song <i>et al.</i> , 2004)
ClosCI-R	GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT		
SondaClos	(FAM)GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG(BHQ-1)		

Na fase inicial, analisou-se a especificidade teórica de todos os *primers* e sondas utilizadas, recorrendo ao *Basic local alignment search toll* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990).

Todas as sondas utilizadas apresentam na extremidade 5' o fluoróforo 6FAM e na extremidade 3' o *Black Hole Quencher-1* (BHQ-1<sup>®</sup>). As sequências de *primers* e sonda, bem como, o tamanho do fragmento gerado são discriminados na (Tabela 7).

### 2.3.2. Otimização do protocolo de PCR em tempo real

Os protocolos para a detecção dos géneros *Bacteroides* e *Prevotella* utilizando a técnica de PCRtr, foi otimizado em estudo anterior (Carvalho, 2016).

Durante a otimização do protocolo para a detecção do género *Clostridium*, foram testadas diferentes condições: concentrações de *primers*, sonda e temperatura de emparelhamento dos *primers*. Numa primeira fase da otimização recorreu-se ao PCR convencional para identificar a temperatura de emparelhamento ideal para os *primers* selecionados, usando DNA de *Clostridium perfringens* obtido a partir de uma cultura pura de um isolado clínico. Para este efeito, foram testadas várias temperaturas (55,0°C, 55,2°C, 55,9°C, 57,0°C, 58°C, 59,4°C, 60,6°C, 61,8°C, 63°C) assim como duas concentrações de *primers* (400nM e 600nM). A reação de PCR foi realizada num volume final de 25 µL, e consistiu em 2 ou 5µL de DNA e 23 ou 20µL da mistura de reagentes. Esta mistura conteve sempre 2,5µL de tampão de reação [10x] (Invitrogen<sup>TM</sup>), 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> [50Mm] (Invitrogen<sup>TM</sup>), 0,5µL de dNTP's [10mM] e 0,2µL de *Taq DNA Polymerase* [5U/µL] (Invitrogen<sup>TM</sup>). O volume dos *primers* foi variando de acordo com as concentrações que se pretendia testar. A quantidade da água foi ajustada de forma a atingir os 25 µL de volume final. A reação de PCR convencional foi realizada no equipamento *T Gradient*, *Biometra* de acordo com as condições discriminadas na Tabela 8. A análise dos produtos de amplificação foi efetuada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Tabela 8 - Condições da reação de PCR convencional, usando o equipamento *T Gradient*, *Biometra*®.

	Nº de ciclos	Duração	Temperatura
Desnaturação inicial	1	2 minutos	95°C
Desnaturação		30 segundos	95°C
Hibridação dos <i>primers</i>	40	30 segundos	55°C - 63°C
Extensão		45 segundos	72°C
Extensão final	1	3 minutos	72°C

A análise dos fragmentos de amplificação por eletroforese em gel de agarose seguiu o seguinte procedimento:

- 1- Pesar 0,525g de agarose *UltraPure*<sup>TM</sup> (Invitrogen) num balão de Erlenmayer de 250ml (gel de agarose a 1,5%). Juntou-se 35ml de tampão TBE [0,5X] (TBE [10X] *UltraPure*<sup>TM</sup>, *Gibco*®)
- 2- Dissolver a quente e deixar arrefecer na bancada até 60°C. Juntar 2,5µL de brometo de etídio (*Bio Rad*) e agitar ligeiramente sem formar bolhas.
- 3- Preparar o suporte para agarose, colocar o pente no suporte respetivo e, verter rapidamente a agarose sobre o molde.
- 4- Deixar solidificar durante 20 minutos, aproximadamente.
- 5- Retirar o pente.
- 6- Colocar 250mL de tampão TBE a 0,5X na tina de eletroforese (*Horizon 58*) de forma a submergir o gel.
- 7- Pipetar 2µL de tampão de carga e 5µL de DNA amplificado. (Composição de tampão de carga: 3,5mL de TBE A 10X (*Gibco*®), 5mL de glicerol, 1mL de azul de bromofenol (1%) (AMRESCO®), 0,5mL de EDTA A 0,5M (*Sigma*®))
- 8- Misturar e aplicar 5µL da mistura no respetivo poço.
- 9- Pipetar 2,5µL de marcador de DNA 50bp DNA Ladder (*BioLabs*®)
- 10- Migrar a 140V durante 20 minutos.
- 11- Observar num transiluminador UV(UVItec®) de luz ultravioleta. Fotografar.

### Protocolo de PCR em tempo real otimizado

Na segunda fase, testaram-se em PCRtr as condições que foram otimizadas no PCR convencional. Foram testadas as temperaturas de 56, 59 e 63°C, várias concentrações de *primers* (300nM, 400nM e 600nM), e dois volumes de DNA (2µL e 5µL). As condições

de amplificação foram adaptadas de Song *et al.* (2004). A técnica de PCR foi realizada no sistema de detecção *Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems). Todas as reações foram efetuadas em duplicado em placas de 96 poços (Applied Biosystems), usando o TaqMan Universal PCR Master Mix [2X], em cada reação foram incluídos sempre, um controlo positivo e um negativo.

A reação de amplificação para a detecção de *Bacteroides* por PCRtr, foi realizada num volume total de 25µL constituído por 5µL de DNA e 20µL de mistura de reagentes. Esta mistura conteve TaqMan Universal PCR Master Mix [2X] (Applied Biosystems), *primers* BactspF e BactspR [600nM] (Invitrogen), sondaBact [200 nM] (Stabvida), e água destilada ultrapura até perfazer 20µL. A reação de PCRtr foi realizado com o seguinte protocolo: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C (desnaturação inicial), seguido de 50 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação) e 45 segundos a 60°C (emparelhamento e extensão).

A reação de PCR para a detecção de *Prevotella* foi realizada num volume total de 20 µL contendo 5µL de DNA e 15µL da mistura de reagentes. Esta mistura conteve TaqMan Universal PCR Master Mix [2X] (Applied Biosystems), *primers* PrevspF e PrevspR [300 nM] (Invitrogen), sondaPrev [200 nM] (Stabvida), e água destilada ultrapura até perfazer os 15µL. A reação de PCRtr foi realizado com o seguinte protocolo: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minutos a 60°C (emparelhamento e extensão).

A reação de PCRtr para a detecção de *Clostridium clusterI* foi realizada num volume total de 25µL contendo 5µL de DNA e 20µL da mistura de reagentes. Esta mistura conteve TaqMan Universal PCR Master Mix [2X] (Applied Biosystems), *primers* ClosCI-F e ClosCI-R [600 nM] (Invitrogen), sondaClos [200 nM] (Stabvida), e água destilada ultrapura até perfazer os 20µL. No ensaio utilizou-se um protocolo que compreendeu: 1 ciclo de 2 minutos a 95°C (desnaturação inicial), 45 ciclo de 20 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundo a 56°C (emparelhamento), e 45 segundos a 72°C (extensão).



### 2.3.4. Sensibilidade analítica dos *primers* e sondas

Para o estudo da sensibilidade analítica dos *primers* e sondas utilizados neste estudo (Tabela 7), os DNAs extraídos foram diluídos até atingirem a concentração equivalente a uma unidade genômica (Figura 8). A concentração de DNA equivalente a uma unidade genômica de *Clostridium* spp. é de 3.6fg/μL. A unidade genômica foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$m = \left[ n \right] \left[ \frac{1.096e-21 \text{ g}}{\text{bp}} \right]$$

m = massa

n = tamanho do genoma (bp)

e-21 = x10<sup>-21</sup>

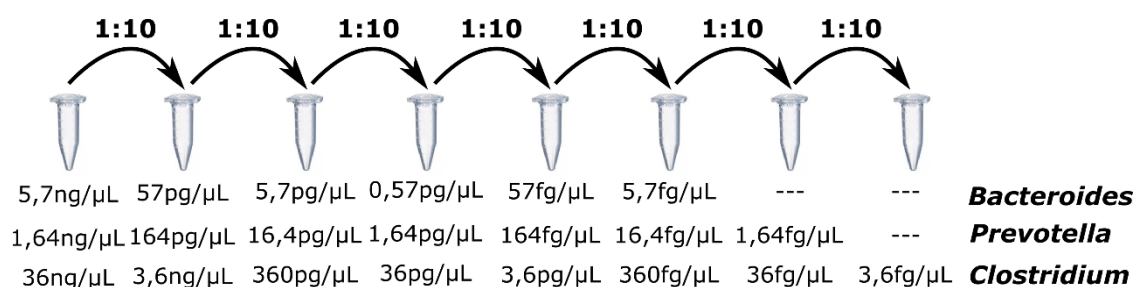


Figura 8 - Esquema das diluições em série realizadas para estudar a sensibilidade analítica dos *primers* e sondas utilizados neste estudo. A concentração inicial das amostras foi determinada no espectrofotômetro (UVI 1101, Biotech Photometer). As concentrações dadas em cada uma das três linhas representam as concentrações finais das diluições de cada espécie incluídas na análise. As amostras foram diluídas em água destilada, estéril e livre de DNA. Legenda: --- representa a última diluição efetuada.

A eficiência dos *primers* foi determinada utilizando as mesmas diluições discriminadas na Figura 8, tendo sido calculada a partir da seguinte equação (QIAGEN, 2010):

$$Eficiência = 10^{(-1/Declive)} - 1$$

Em cada ensaio foram testados em simultâneos controlos negativos e positivos.

### 2.3.3. Especificidade analítica dos *primers* e sondas

No estudo da especificidade analítica dos *primers* e sondas, foram utilizados DNAs a uma concentração de 5ng/μL, extraídos de culturas puras de isolados provenientes de produtos biológicos, no total foram estudadas 15 espécies bacterianas. Este grupo incluiu bactérias anaeróbias facultativas e estritas, normalmente encontradas em infecções causadas por bactérias anaeróbias (Finegold & Wexler, 1996b; Murphy & Frick, 2013) (Tabela 9). Para a extração do DNA genômico de isolados clínicos a partir de cultura pura utilizou-se o kit *InstaGene™ Matrix* (Bio-Rad).

Tabela 9 - Espécies bacterianas utilizadas no estudo da especificidade analítica dos *primers* e sondas. As amostras foram isoladas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz e a cultura pura foi extraída e usada na análise de especificidade.

Género	Espécies
Anaeróbios estritos	
<i>Bacteroides</i>	<i>B. fragilis</i>
	<i>B. stercoris</i>
	<i>B. thetaiotaomicron</i>
<i>Prevotella</i>	<i>P. buccae</i>
	<i>P. disiens</i>
	<i>P. intermedia</i>
	<i>P. melaninogenica</i>
	<i>P. oralis</i>
<i>Clostridium</i>	<i>C. perfringens</i>
<i>Finegoldia</i>	<i>F. magna</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. anaerobius</i>
Anaeróbios facultativos	
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>S. epidermidis</i>

### 2.4. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa de estatística computacional R v.3.3.3 (R Core Team, 2017) usando um nível de confiança de 95% ( $\alpha=0,05$ ). Quando possível, os dados foram apresentados em frequência e percentagem. As frequências foram comparadas usando o teste de  $\chi^2$  que testa a igualdade da frequência

observada com a frequência esperada. Este mesmo teste foi ainda usado para testar a associação entre duas ou mais variáveis. Neste caso, as frequências foram organizadas numa tabela de contingência antes da realização do teste. Para identificar o efeito de certas variáveis (e.g. consistência da amostra, tratamento) na positividade das amostras, usou-se uma regressão logística tendo como variável dependente a positividade das amostras. O melhor modelo foi escolhido como proposto por Burnham & Anderson (2004) com base no *Akaike Information Criterion* (AIC). Em caso de múltiplas comparações, o valor p foi ajustado usando o método de Holm (Holm, 1979).

A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivos e negativos foram calculadas usando, respetivamente, as seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{Verdadeiro positivo}}{(\text{Verdadeiro positivo} + \text{Falso negativo})}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{Verdadeiro negativo}}{(\text{Falso positivo} + \text{Verdadeiro negativo})}$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \frac{\text{Verdadeiro positivo}}{(\text{Verdadeiro positivo} + \text{Falso positivo})}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \frac{\text{Verdadeiro negativo}}{(\text{Falso negativo} + \text{Verdadeiro negativo})}$$

### 3. Resultados

#### 3.1 Caracterização das amostras

Durante este estudo, foram recolhidas 175 amostras, das quais 80 (46%) foram classificadas como exsudados purulento e 95 (54%) classificadas como líquidos biológicos. As amostras foram colhidas em três hospitais pertencentes ao CHLO (HEM, HSC e HSFY), e foram enviadas para o LMBM/HEM para diagnóstico de bactérias anaeróbias. Todas as amostras provieram de pacientes com suspeita de infecções por bactérias anaeróbias. Das amostras recolhidas, foram rejeitadas 17 (9,72%) por não terem quantidade suficiente, pelo que, apenas 158 foram consideradas neste estudo. Na Tabela 10 encontra-se a distribuição dos diferentes tipos de amostras pelos três hospitais.

Tabela 10 – Distribuição das amostras recolhidas no período de Outubro de 2016 a Maio de 2017 nos três hospitais do CHLO segundo a sua consistência e volume. A percentagem de amostras segundo a sua consistência foi obtida tendo em consideração o valor total, 80 e 95 para exsudados purulentos e líquidos biológicos, respetivamente.

		HEM	HSC	HSFY	Total
<b>Exsudados purulentos</b>	>200µl	27	11	30	68 (39%)
	<200µl	6	1	5	12 (7%)
<b>Líquidos biológicos</b>	>200µl	17	27	46	90 (52%)
	<200µl	0	2	3	5 (3%)
<b>Total</b>		50 (29%)	41 (23%)	84 (48%)	175 (100%)

Dado que as amostras apresentavam consistência diferente foi necessário selecionar kits de extração diferentes para as processar. Entretanto, verificamos que a extração segundo a classificação apresentada na Tabela 10 foi ineficiente em algumas das amostras dado que, tinham sido positivas na cultura e eram negativas na PCR. A hipótese por nós colocada foi a de a classificação inicial, quanto à consistência de algumas amostras, não ter sido adequada, e consequentemente ter sido aplicado na extração o kit inadequado.

Sendo assim, decidimos extraí-las com o kit mais apropriado à sua consistência e não de acordo com a classificação inicial. Nesse sentido, oito amostras (12%) das classificadas inicialmente como exsudados purulentos foram reclassificadas como amostras purulentas com consistência líquida (purulenta/líquida) consequentemente, foram extraídas com o kit apropriado para extração de líquidos biológicos. Da mesma forma, 34 amostras (38%) das amostras classificadas inicialmente como líquidos biológicos, foram reclassificadas como amostras líquidas com consistência viscosa (líquidas/viscosa) e consequentemente foram extraídos com kit apropriado para extração de exsudados purulentos (Figura 9).

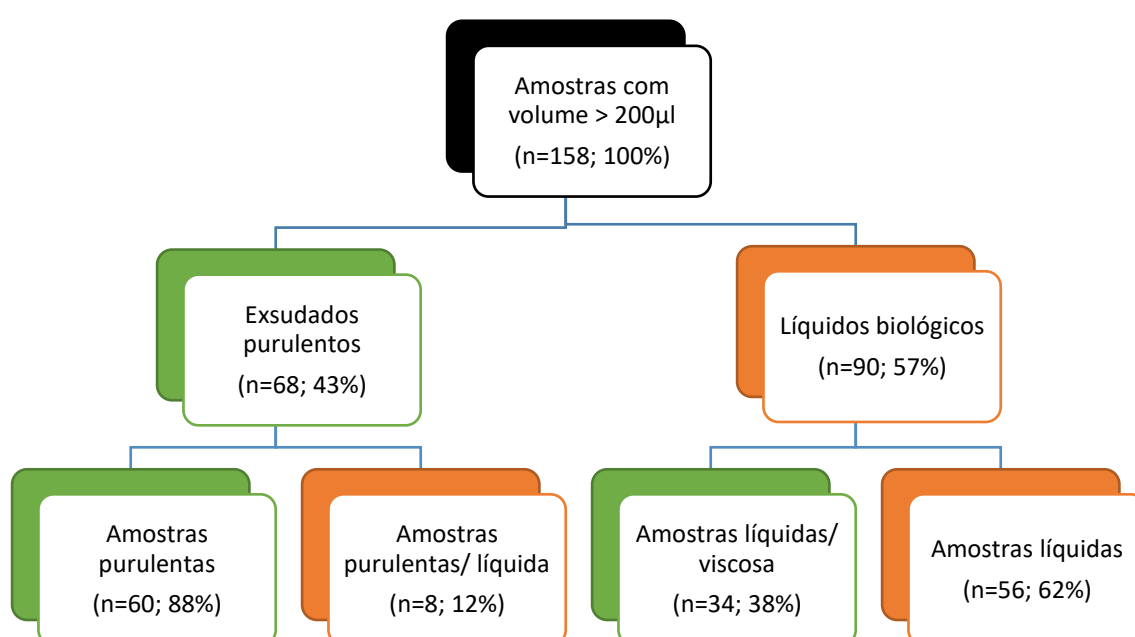


Figura 9 – Reclassificação das amostras consoante as suas consistências. Amostras classificadas no LMBM | HEM foram inspecionadas visualmente durante a otimização do protocolo da extração e reclassificadas de acordo com as suas consistências.

### 3.2. Otimização de protocolo de extração

Durante a otimização do protocolo de extração de DNA a partir de líquidos biológicos utilizando o kit *PureLink Genomic DNA Mini Kit*, testou-se os dois processos de lise, de Gram positivo e de Gram negativo, mostrou que ambos apresentavam uma boa eficiência na extração de DNA deste tipo de amostras. Foi ainda avaliada a influência da concentração das células bacterianas por centrifugação, antes do processo de extração

propriamente dita, constatando-se que esta afetava negativamente a eficiência da extração (Tabela 11).

Tabela 11 - Otimização do protocolo de extração de DNA a partir de líquidos biológicos utilizando protocolos para a lise destinados às bactérias de Gram positivo e para a lise de bactérias de Gram negativo. Ambos os protocolos foram adaptados do kit *PureLink Genomic DNA Mini Kit*. A eficiência da extração foi determinada através da comparação dos valores de Ct obtidos após a realização do PCRtr. Ambas as amostras usadas na otimização foram positivas por cultura.

Amostras	Lise de Gram positivos		Lise de Gram negativos	
	Com centrifugação	Sem centrifugação	Com centrifugação	Sem centrifugação
111	37;38	30;30	37;37	30;29
135	34;35,	21;20	37;38	22;21

Tabela 12 - Otimização do protocolo de extração de DNA a partir de amostras purulentas utilizando dois kits de extração (*QIAamp® DNA Stool Mini Kit- α* e *QIAamp® DNA Mini Kit-β*). Todas as amostras usadas tinham sido diagnosticadas, por cultura, como positivas para o *Bacteroides* e /ou *Prevotella*.

Amostra	Resultado cultura	PCRtr para a detecção de <i>Bacteroides</i> (Ct)		PCRtr para detecção de <i>Prevotella</i> (Ct)	
		Kit β	Kit α	Kit β	Kit α
30	<i>B. thetaiotaomicron</i> ;	Positivo (34;34)	Positivo (28;27)		
38	<i>B. ovatus</i> ;	Negativo	Positivo (31;32)		
50	<i>B. fragilis</i> ; <i>P. intermedia</i>	Negativo	Positivo (26;21)	Negativo	Positivo (21;22)
53	<i>B. thetaiotaomicron</i> ;	Negativo	Positivo (33;34)		
71	<i>B. thetaiotaomicron</i>	Positivo (31;32)	Positivo (31;31)		
72	<i>B. ovatus</i> ; <i>P. disiens</i> ,	Positivo (26;26)	Positivo (22;22)	Positivo (26;25)	Positivo (25;25)

A otimização do protocolo de extração a partir de exsudados purulentos, revelou que o kit *QIAamp® DNA Stool Mini Kit*, usando o protocolo *Isolation of DNA from Stool for pathogen Detection*, foi mais eficiente comparando com o kit *QIAamp® DNA Mini Kit*,

usando o protocolo *DNA purification from tissues* (Tabela 12). Das seis amostras testadas, que tinham sido positivas por cultura, verificou-se que também todas foram positivas por PCRtr quando extraídas com o kit *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* enquanto que, quando extraídas com kit *QIAamp® DNA Mini Kit*, apenas metade delas foi positiva. Verificou-se ainda que, das que foram positivas quando extraídas com este último kit (*QIAamp® DNA Mini Kit*), os valores do Cts foram iguais ou superiores aos obtidos com a extração do primeiro kit (*QIAamp® DNA Stool Mini Kit*) (Tabela 12).

### 3.3. Identificação de bactérias aeróbias / anaeróbias facultativas por cultura

A pesquisa de bactérias por cultura revelou que 69 (44%) das amostras apresentavam bactérias aeróbias. Esta proporção não foi estatisticamente significativa comparando com a proporção de amostras negativas ( $\chi^2=2,53$ ; valor  $p=0.11$ ), (Figura 10A). Verificamos ainda que, das 69 amostras positivas, 32 (46%) apresentavam mais do que uma espécie de bactéria aeróbia (Figura 10B). O número de amostras com três espécies de bactérias foi inferior ao esperado ( $\chi^2_{GL=2}=15,91$ ; valor  $p<0,001$ ; valor esperado = 23), totalizando apenas 10 (15%) das amostras em que foram identificadas bactérias aeróbias. Por outro lado, o número de amostras com apenas uma bactéria aeróbia foi superior ao esperado ( $\chi^2_{GL=2}=15,91$ ; valor  $p<0,001$ ), totalizando 37 (54%) das amostras positivas. O número das amostras com duas bactérias foi igual a esperada 22 (32%).

No total, foram identificadas pelo menos 30 espécies de bactérias aeróbias, sendo as mais frequentes *Escherichia coli* (n=28, 18%), *Staphylococcus aureus* (n=13, 8%), *Streptococcus anginosus* (n=85, 06%), *Enterococcus faecalis* (n=63, 80%) e *E. avium* (n=53, 16%) (Figura 10C).

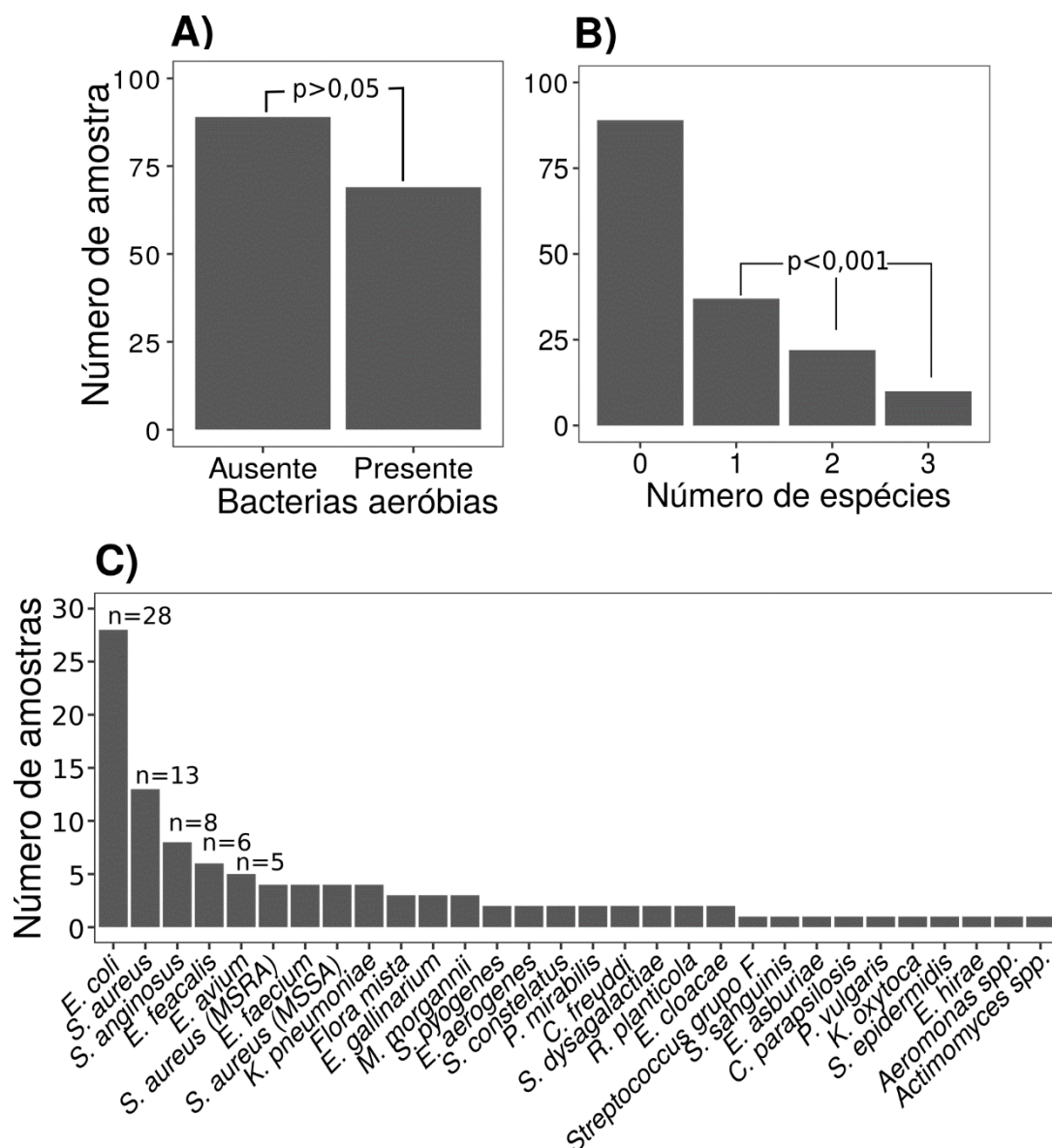


Figura 10 - Presença de bactérias aeróbias identificadas por cultura no LMBM/HEM - CHLO. (A) Número de amostras positivas para bactérias aeróbias. (B) Número de amostras com uma, duas e três espécies de bactérias aeróbias. (C) Espécies de bactérias aeróbias identificadas nas 69 amostras que foram positivas. O número de amostras das cinco espécies mais frequentes foi apresentado. O valor p foi obtido após análise com o teste de  $\chi^2$ .

### 3.4. Identificação de bactérias anaeróbias por cultura

Das amostras analisadas por cultura apenas 31 (20%) foram positivas para bactérias anaeróbias (Figura 11A). Contrariamente ao referido no ponto anterior, em que analisamos as amostras positivas para bactérias aeróbias, verificamos que só uma parte



minoritária das amostras analisadas, eram positivas para bactérias anaeróbias ( $\chi^2=58,33$ ; valor  $p<0,001$ ). No mesmo sentido, apenas 19 (12%) do total das amostras analisadas apresentaram mais do que uma espécie de bactéria anaeróbia (Figura 11B), mas contrariamente ao observado para as bactérias aeróbias, a proporção de amostras com uma ( $n=12$ , 39%), duas ( $n=11$ , 35%) ou três ( $n=8$ , 26%) espécies diferentes de bactérias anaeróbias não foi estatisticamente significativo ( $\chi^2_{GL=2}=0,84$ ; valor  $p=0,66$ ). Pelo menos 23 espécies de bactérias anaeróbias foram identificadas por cultura, sendo as espécies mais abundantes *Bacterioides thetaiotaomicron* ( $n=11$ , 7%), *Prevotella disiens* ( $n=7$ , 4%), *B. fragilis* ( $n=5$ , 3%), *Clostridium perfringens* ( $n=4$ , 3%) e *B. ovatus* ( $n=4$ , 3%) (Figura 11C). As espécies de bactérias anaeróbias identificadas por cultura pertenciam a 10 géneros, sendo os mais frequentes o género *Bacterioides* ( $n=22$ , 14%), *Prevotella* ( $n=12$ , 9%,) e *Clostridium* ( $n=6$ , 3%), (Figura 11E). Para efeitos comparativos, neste estudo, apenas as quatro amostras (2,53%,  $n=4$ ) positivas para as bactérias do género *clostridium cluster* I serão consideradas, porque os *primers* utilizados são específicos só para este *cluster*.

À semelhança do efetuado para as espécies de bactérias anaeróbias, também observamos as infeções por um ( $n=13$ , 8%), dois ( $n=13$ , 8%) e três ( $n=5$ , 3%) géneros na mesma amostra (Figura 11D).

### 3.5. Identificação de bactérias anaeróbias por PCRtr

Os *primers* e sondas para a deteção de *Bacterioides* e *Prevotella* foram otimizados num estudo recente (Carvalho, 2016), por isso não foram repetidos neste estudo. Os *primers* e a sonda para a deteção de bactérias do género *Clostridium* (Tabela 7) foram obtidos em Song *et al.* (2004), mas as suas concentrações e as condições de PCR foram alvo de otimização utilizando o PCR convencional. Durante a otimização, verificamos que com a temperatura usada por Song *et al.* (2004) (63°C) não amplificou nenhuma banda e, isto foi, independente da concentração final dos *primers* (Figura 13A). Na verdade, os nossos resultados desencorajam a utilização de temperaturas igual ou acima dos 62°C. Por causa disso, optamos dentre as temperaturas testadas, por usar a temperatura de emparelhamento mais baixa (56°C). Os nossos resultados sugeriram ainda que, nas condições testadas, a concentração dos *primers* também afeta a amplificação (Figura

13). Verificamos que esta reação era específica, ou seja, detetava unicamente bactérias do género *Clostridium*, pois além do *C. perfringens* que apresentou resultados positivo com um Ct médio de 28, testamos outras 14 espécies de bactérias (Tabela 9) comumente encontradas em amostras clínicas, e não houve amplificação em nenhuma delas. Em nenhuma delas detetou-se sinais de amplificação o que nos levou a concluir que os *primers* eram específicos.

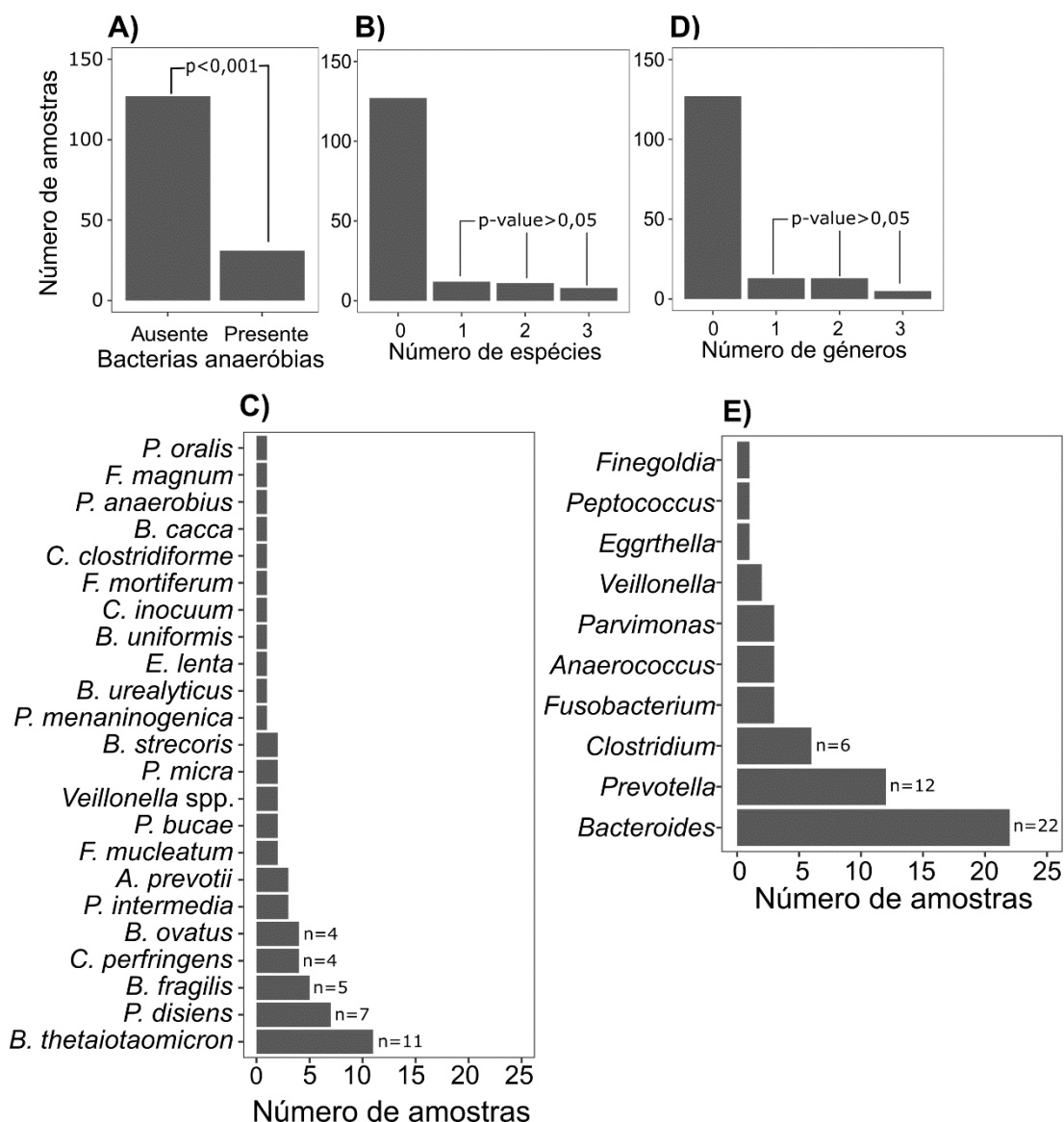


Figura 11 - Número de espécies de bactérias anaeróbias identificadas por cultura no LMBM/HEM - CHLO. (A) Número de amostras positivas para bactérias anaeróbias identificadas por cultura. (B) Número de amostras com uma, duas ou três espécies de bactérias anaeróbias. (C) Espécies de bactérias anaeróbias identificadas nas 31 amostras positivas por cultura. (D) Número de amostras com um, dois ou três géneros de bactérias anaeróbias. (E) Número de amostras positivos para vários géneros de bactérias

anaeróbias. O número dos três gêneros mais abundantes foi apresentado. Os valores de p em A, B e C foram obtidos a partir do teste de  $\chi^2$ .

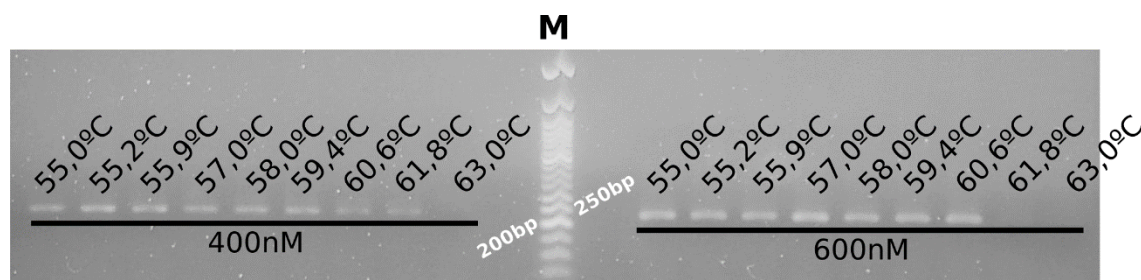


Figura 12 – Otimização de condições para a detecção de *Clostridium* em amostras clínicas por PCR. O efeito da temperatura de emparelhamento (55°C a 63°C) e duas concentrações de *primers* foram testados. DNA de *C. perfringens* foi obtido a partir de cultura pura. Legenda: M = 50bp DNA Ladder (BioLabs®).

Observamos que a sensibilidade do PCRtr para a detecção das bactérias do gênero *Clostridium* foi baixa quando comparada com a sensibilidade do PCRtr para a detecção de *Bacteroides* e *Prevotella*. Com uma concentração de DNA de 3,6pg/ $\mu$ L, que corresponde a aproximadamente 1000 unidades genômicas por  $\mu$ L (UG/ $\mu$ L) de *Clostridium*, obtivemos sinal de detecção aos 42 ciclos de amplificação. O PCRtr para a detecção de *Bacteroides* foi o mais sensível. Este foi capaz de detectar amostras a uma diluição correspondente aproximadamente a 1 UG/ $\mu$ L (5,7fg/ $\mu$ L), apresentando estes, valores de Ct médio de 37. O PCRtr para a detecção de *Prevotella* foi menos sensível do que o para a detecção de *Bacteroides*, mas ainda assim, mais sensível do que o PCRtr para a detecção de *Clostridium*. Passado aproximadamente 39 ciclos de PCRtr, obteve-se sinal de detecção de *Prevotella* em uma diluição com aproximadamente 10 UG/ $\mu$ L (16,4fg/ $\mu$ L) (Tabela 13). A eficiência dos *primers* e sondas utilizadas na detecção dos três gêneros de bactérias foi estimada. Verificamos uma eficiência de 85%, 92% e 106% para *Prevotella*, *Clostridium*, e *Bacteroides*, respectivamente (Figura 13 A).

Por causa desta baixa sensibilidade, optamos por não testar todas as amostras para a presença de *Clostridium*. Das 158 amostras consideradas neste estudo, apenas 82 (52%) foram testadas por PCRtr para a presença deste grupo de bactérias e, por isso, os dados foram apresentados em separado. Contrariamente, todas as amostras foram testadas para a presença de *Bacteroides* e *Prevotella* uma vez que a sensibilidade destas foi maior.

Tabela 13 – Sensibilidade analítica dos *primers* e sondas para a detecção dos três gêneros de bactérias anaeróbias, alvos desse estudo, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium*. Foram apresentados as concentrações dos DNA testadas em cada diluição e os respectivos resultados. Os resultados quando positivos foram apresentados os valores dos Cts.

<i>Bacteroides</i>		<i>Prevotella</i>		<i>Clostridium</i>	
[DNA]	Resultados (Ct)	[DNA]	Resultados (Ct)	[DNA]	Resultado (Ct)
<b>5,7ng/μL</b>	Positivo (16; 16)	<b>1,64ng/μL</b>	Positivo (20; 20)	<b>36ng/μl</b>	Positivo (28; 29)
<b>0,57ng/μL</b>	Positivo (19; 19)	<b>164pg/μL</b>	Positivo (23; 24)	<b>3,6ng/μl</b>	Positivo (30; 30)
<b>57pg/μL</b>	Positivo (22; 22)	<b>16,4pg/μL</b>	Positivo (27; 27)	<b>360pg/μl</b>	Positivo (34; 34)
<b>5,7pg/μL</b>	Positivo (26; 27)	<b>1,64pg/μL</b>	Positivo (31; 31)	<b>36pg/μl</b>	Positivo (38; 37)
<b>0,57pg/μL</b>	Positivo (30; 30)	<b>164fg/μL</b>	Positivo (35; 35)	<b>3,6pg/μl</b>	Positivo (42; 42)
<b>57fg/μL</b>	Positivo (34; 34)	<b>16,4fg/μL</b>	Positivo (39; 39)	<b>360fg/μl</b>	Negativo
<b>5,7fg/μL</b>	Positivo (37; 37)	<b>1,64fg/μL</b>	Negativo	<b>36fg/μl</b>	Negativo
				<b>3,6fg/μl</b>	Negativo

Da análise dos dados verificamos que 49 (31%) das amostras foram positivas por PCRtr para bactérias do gênero *Bacteroides* e/ou *Prevotella* (Figura 13B). A análise dos dados mostrou que obtivemos mais resultados negativos para os gêneros, *Bacteroides* e *Prevotellas*, do que esperado ( $\chi^2=22,78$ ; valor  $p<0,001$ ). Mais especificamente, observamos que 36 (23%) das amostras foram positivas para bactérias do gênero *Bacteroides* e 28 (18%) foram positivas para as do gênero *Prevotella* (Figura 13C). Observamos ainda que 15 amostras (9%) estavam co-infetadas por *Bacteroides* e *Prevotella*, não chegando assim perto da metade das amostras positivas por PCRtr ( $n=49$ ) ( $\chi^2=7,38$ ; valor  $p=0,006$ ).

Apenas 3 (4%) das 82 amostras testadas para *Clostridium* foram classificadas como positivas por PCRtr. Esta frequência foi muito menor que a esperada ( $\chi^2=70,44$ ; valor  $p<0,001$ ).

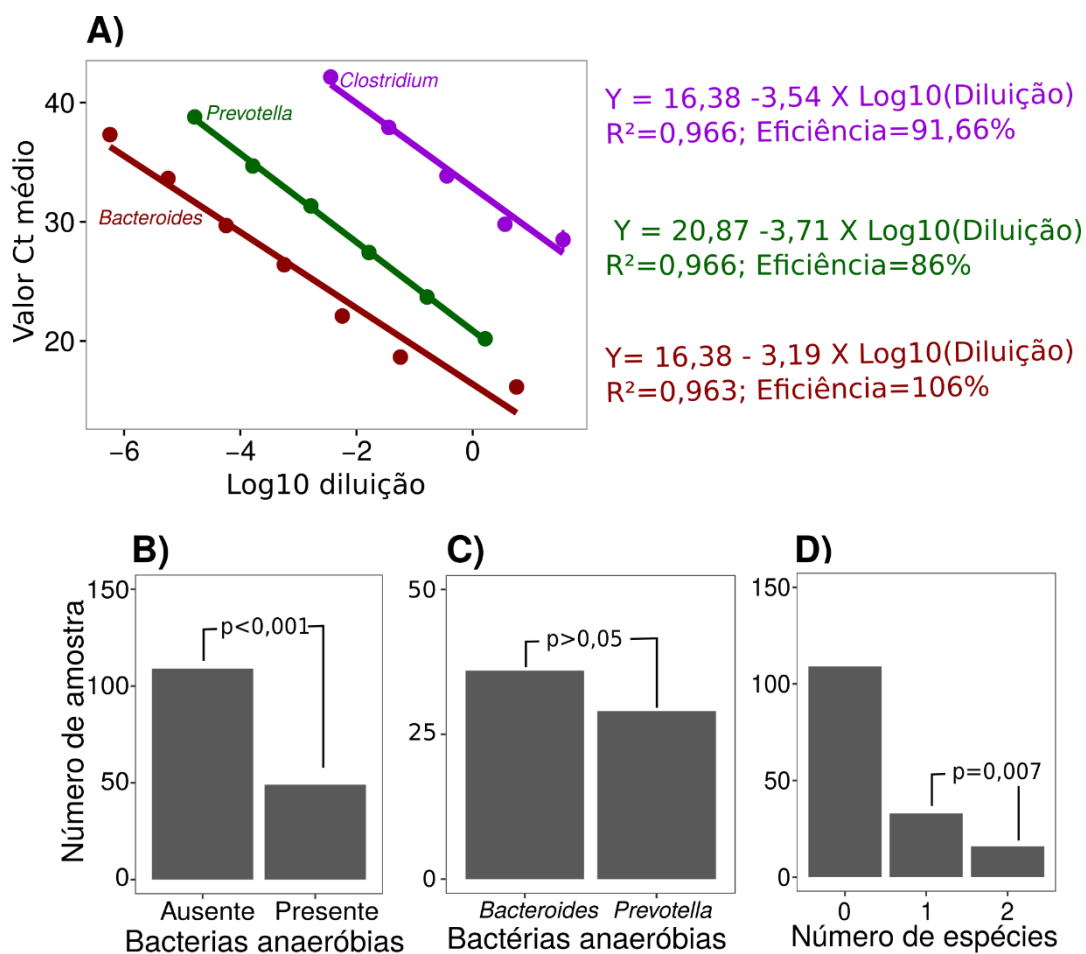


Figura 13 - Detecção de bactérias anaeróbias em amostras clínicas por PCRtr. (A) Determinação da eficiência dos *primers* e sondas para a detecção de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Prevotella*. Diluições em série (10X) foram usadas e permitiu traçar uma reta, cujo declive foi usado para a determinação da eficiência. (B) Número de amostras positivas para bactérias anaeróbias. (C) Número de amostras positivas para *Bacteroides* e *Prevotella*. (D) Percentagem de amostras com uma ou duas bactérias anaeróbias detetadas por PCRtr. A significância estatística foi obtida usando o teste de  $\chi^2$ .

### 3.6. Comparação de técnicas de identificação de bactérias anaeróbias

Dado que a maioria das amostras ( $n=104$ , 66%;) eram provenientes de pacientes sob tratamento (antibioterapia) ( $\chi^2=25,31$ ; valor  $p < 0,001$ ), decidimos usar a regressão logística para analisar o seu efeito na presença de bactérias anaeróbias identificadas tanto por cultura como também por PCRtr. Entretanto, para 11 amostras (7%) a informação sobre a antibioterapia era desconhecida. A regressão logística relevou que o tratamento não afetou a presença de bactérias anaeróbias identificadas por cultura

(OR=0,99; valor  $p=0,91$ ). Verificou-se que apenas 8 (5%) das amostras provenientes de pacientes que não estavam sob tratamento foram positivas para bactérias anaeróbias. Por outro lado, 21 (14%) das amostras de pacientes sob tratamento foram positivas, por cultura, para bactérias anaeróbias (Tabela 14). Da mesma maneira, não foi observado evidências de que o tratamento esteve associado com a presença de bactérias anaeróbias identificadas por PCRtr (OR=0,99; valor  $p=0,97$ ; Tabela 14). Aproximadamente 35 (24%) das amostras que foram positivas para bactérias anaeróbias identificadas por PCRtr foram provenientes de pacientes sob tratamento. Apenas 13 (9%) das amostras positivas foram provenientes de pacientes não sujeitos ao tratamento. Observamos o mesmo padrão quando amostras positivas unicamente para *Bacteroides* ou *Prevotella* foram analisadas separadamente (Tabela 14).

Por outro lado, a consistência da amostra foi um fator determinante na presença de bactérias anaeróbias identificadas por cultura (valor  $p<0,001$ ). Foi em amostras líquidas que observamos a mais baixa presença de bactérias anaeróbias identificadas por cultura. Apenas 3 das 56 (5%) amostras líquidas foram positivas para bactérias anaeróbias. Comparações múltiplas revelaram que, esta foi estatisticamente diferente das restantes consistências (valor  $p<0,05$ ). O padrão das amostras identificadas por PCRtr foi similar ao observado pela técnica de cultura (Tabela 14). Verificamos que o número de amostras positivas identificadas por PCRtr foi menor nas amostras de consistência líquida. Entretanto, o número de amostras de consistência líquida positivas por PCRtr não foi estatisticamente significativo do número de amostras de consistência purulenta com aspeto líquido (valor  $p=0,06$ ; Tabela 14). O mesmo padrão foi observado para amostras positivas unicamente para *Bacteroides* ou *Prevotella* quando analisados separadamente.

Verificamos ainda que a presença de bactérias aeróbias (identificadas por cultura) associou-se à presença de bactérias anaeróbias identificadas por cultura (OR=7,74; valor  $p<0,001$ ). No entanto, apesar da tendência de haver mais amostras positivas entre o grupo com presença de bactérias aeróbias identificadas por cultura, o número de amostras positivas para bactérias anaeróbias identificadas por PCRtr não se associou estatisticamente com a presença de bactérias aeróbias (OR=; valor  $p>0,05$ ).

Tabela 14 - Análise comparativa dos resultados obtidos por técnicas de identificação de bactérias anaeróbias (cultura e PCRtr). A frequência das amostras foi categorizada pelo tratamento e pela consistência da amostra. A totalidade das amostras (n=158) foram consideradas durante o cálculo da percentagem, excepto quando se tratava da análise da associação com o tratamento, onde só foram consideradas 147 amostras cuja essa informação era conhecida. O efeito destas variáveis na presença das bactérias anaeróbias foi analisado através da regressão logística. Dados relativos a presença de *Bacteroides* e *Prevotella* também foram apresentados. Legenda: (-) amostras negativas para bactérias anaeróbias; (+) amostras positivas para bactérias anaeróbias; (N) número de amostras; (%) percentagem.

		Identificação por cultura						Identificação por PCRtr					
		Amostras		<i>Bacteroides</i>		<i>Prevotella</i>		Amostras		<i>Bacteroides</i>		<i>Prevotella</i>	
		- N (%)	+ N (%)	- N (%)	+ N (%)	- N (%)	+ N (%)	- N (%)	+ N (%)	- N (%)	+ N (%)	- N (%)	+ N (%)
Tratamento	Não	35 (24)	8 (5)	37 (25)	6 (4)	39 (27)	4 (3)	30 (20)	13 (9)	35 (24)	8 (5)	35 (22)	8 (5)
	Sim	83 (56)	21 (14)	88 (60)	16 (11)	96 (65)	8 (5)	69 (47)	35 (24)	76 (52)	28 (19)	84 (53)	20 (13)
Consistência da amostra	Líquida	53 (34)	3 (2)	55 (35)	1 (1)	55 (35)	1 (0,6)	53 (34)	3 (2)	53 (34)	3 (2)	54 (34)	2 (1)
	Líquida/viscosa	26 (16)	8 (5)	27 (17)	7 (4)	33 (21)	1 (0,6)	17 (11)	17 (11)	21 (13)	13 (8)	26 (16)	8 (5)
	Purulenta	43 (27)	17 (11)	49 (31)	11 (7)	51 (32)	9 (6)	34 (22)	26 (16)	43 (27)	17 (11)	43 (27)	17 (11)
	Purulenta/líquida	5 (3)	3 (2)	5 (3)	3 (2)	7 (4)	1 (1)	5 (3)	3 (2)	5 (3)	3 (2)	7 (4)	1 (1)
Aeróbias	Não	82 (52)	7 (4)	86 (54)	3 (2)	86 (54)	3 (2)	68 (43)	21 (13)	77 (49)	12 (8)	75 (47)	14 (9)
	Sim	45 (28)	24 (15)	50 (32)	19 (12)	60 (38)	9 (6)	41 (26)	28 (18)	45 (28)	24 (15)	55 (35)	14 (9)



Por seu turno, a regressão logística revelou que a presença de bactérias do género *Clostridium* não se associou nem ao tratamento (valor  $p>0,05$ ), nem à consistência da amostra (valor  $p>0,05$ ), nem à presença de bactérias aeróbias (valor  $p>0,05$ ). Como é possível observar na (Tabela 15), esse facto foi independente da técnica de identificação usada. Por outras palavras, contrariamente à presença de *Bacteroides* e/ou *Prevotella*, nem por cultura, nem por PCRtr, não se observou evidências de que a presença das bactérias do género *Clostridium* identificadas por cultura ou por PCRtr estavam associadas ao tratamento ou à consistência da amostra.

Tabela 15 - Análise comparativa dos resultados obtidos das técnicas de diagnóstico de *Clostridium*. O efeito do tratamento e da consistência das amostras foi analisada usando a regressão logística. O número de amostras (e percentagem) relativa ao universo analisado ( $n=82$ ) foram apresentadas. Legenda: (-) amostras negativas para bactérias anaeróbias; (+) amostras positivas para bactérias anaeróbias; (N) número de amostras; (%) percentagem. Uma amostra positiva para *Clostridium* por cultura não apresentava informação de antibioterapia e, por isso, não foi apresentada na tabela.

	Cultura		PCRtr	
	+	-	+	-
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Tratamento				
Não	0 (0)	15 (20)	0 (0)	15 (20)
Sim	3 (4)	57 (76)	3 (4)	57 (76)
Consistência da amostra				
Líquida	1 (1)	2 (2)	0 (0)	3 (4)
Líquida/viscosa	2 (2)	24 (29)	2 (2)	24 (29)
Purulenta	1 (1)	50 (61)	1 (1)	50 (61)
Purulenta/líquida	0 (5)	2 (2)	0 (0)	2 (2)
Presença de aeróbios				
Não	1 (1)	38 (48)	0 (0)	39 (48)
Sim	3 (2)	40 (42)	3 (4)	40 (49)



### 3.7. Sensibilidade e especificidade da técnica de PCRtr na identificação de bactérias anaeróbias

Neste estudo, o número de amostras positivas para bactérias anaeróbias identificadas por PCRtr foi maior do que o número das identificadas por cultura (Figura 11A, Figura 13B e Tabela 16). Para *Bacteroides* e *Prevotella*, mas não para *Clostridium*, o número de amostras positivas por PCRtr foi superior do que aquela obtida por cultura (Tabela 16). A sensibilidade do PCRtr para a detecção de *Bacteroides* foi de 82% e a especificidade de 87%. Da mesma forma, a sensibilidade e especificidade do PCRtr para a detecção de *Prevotella* foi de 75% e 87%, respectivamente (Tabela 16).

Tabela 16 - Sensibilidade e especificidade da técnica de identificação de bactérias anaeróbias por PCRtr quando comparada com a identificação por cultura (referência). A especificidade e a sensibilidade foram calculadas tendo em consideração o universo de amostras analisadas para cada bactéria em estudo (158 para *Bacteroides* e *Prevotella*, respectivamente, e 82 para *Clostridium*).

		Cultura		
		Positivo	Negativo	Total
<i>Bacteroides</i>	Positivo	18	18	36
	Negativo	4	118	122
	Total	22	136	158
	Sensibilidade:	82%		
	Especificidade:	87%		
PCRtr <i>Prevotella</i>		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	9	19	28
	Negativo	3	127	130
	Total	12	146	158
	Sensibilidade:	75%		
<i>Clostridium</i>		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	3	0	3
	Negativo	1	78	79
	Total	4	78	82
	Sensibilidade:	75%		
	Especificidade:	100%		

Sensibilidade do PCRtr = número de amostras positivas por PCRtr e cultura / número de amostras positivas por cultura; especificidade do PCRtr = número de amostras negativas por PCRtr e cultura / número de amostras negativas por cultura.

Para confirmar a veracidade dos valores de sensibilidade e especificidade estimados neste estudo, decidimos confirmar a presença de *Prevotella* nas amostras positivas por PCRtr e negativas por cultura (n=19). Para este efeito, repetimos a extração e o PCRtr das 16 amostras positivas por PCRtr e negativas por cultura e, os produtos de PCR das amostras positivas foram sequenciados pelo método de Sanger. Destas amostras, 15 foram positivas para bactérias de género *Prevotella* e, de uma delas, a qualidade de sequenciação não permitiu quaisquer análises (Anexo 3). Este resultado confirmou assim, uma maior sensibilidade do PCRtr quando comparado com a identificação por cultura.

Relativamente à identificação por cultura, o PCRtr para a identificação de *Clostridium cluster* I apresenta uma sensibilidade de 75% e, uma boa especificidade (100%) já que nenhuma amostra positiva por PCRtr foi negativa por cultura (Tabela13). Por outro lado, o PCRtr não detetou uma amostra positiva por cultura. Contrariamente ao observado para *Bacteroides* e *Prevotella*, a identificação do *Clostridium cluster* I por cultura foi tão sensível quanto a identificação por PCRtr.

Os valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) foram calculados para a deteção dos três géneros. No que desrespeito ao VPP, ele foi de 50%, 32% e 100% para *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium* respetivamente. O VPN foi de 97%, 98% e 99% para *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium* respetivamente.

## 4. Discussão e conclusões

Este estudo teve como principal objetivo a otimização de uma técnica de biologia molecular (PCRtr) para a detecção de bactérias anaeróbias em amostras clínicas recolhidas em três hospitais do Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental. A nossa estratégia fundamentou-se em recolher amostras no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Egas Moniz e analisar por PCRtr a presença de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Prevotella* e comparar esses resultados com os obtidos no exame cultural, contribuindo para melhorar o diagnóstico das infeções por bactérias anaeróbias.

O uso de amostras clínicas para a realização de pesquisas científicas apresenta vários desafios que devem ser analisados e ultrapassados. Por exemplo, o tipo de amostra selecionado influencia vários passos durante o seu processamento e o resultado final, tais como a sua colheita, armazenamento, transporte, método de extração e a quantidade e qualidade do DNA obtido (Vaught & Henderson, 2011; Lagier *et al.*, 2015). Neste estudo, foram recolhidas amostras provenientes de líquidos biológicos (por exemplo biliar e líquidos sinoviais) e amostras provenientes de exsudados purulentos (por exemplo feridas cirúrgicas e pus de abscessos). Todas as amostras foram corretamente transportadas e armazenadas até a realização do estudo, para maximizar a eficiência e qualidade da extração, e foram usados dois kits comerciais de extração otimizados para cada um destes grupos de amostras. Além disso, foram ainda necessárias otimizações adicionais nos protocolos de extração selecionados, de forma a permitir o seu uso neste estudo. Finalmente, foi também necessário a reclassificação das amostras clínicas de acordo com o seu aspeto (Figura 9), esta decisão mostrou ter sido um dos fatores decisivos para os resultados obtidos no presente estudo.

Na primeira parte dos nossos resultados analisámos os dados obtidos na identificação de bactérias aeróbias por culturas efetuadas no LMBM/HEM, com o objetivo de documentar a existência de infeções mistas, isto é, com presença simultânea de bactérias aeróbias/anaeróbias facultativas e anaeróbias, o que é habitual ocorrer nas infeções por anaeróbios.

Das 158 amostras analisadas metade foi positiva para bactérias aeróbias, tendo sido identificadas pelo menos 30 espécies de bactérias aeróbias. Dados semelhantes foram encontrados num outro estudo realizado em ambiente hospitalar em Lisboa (Mendes *et al.*, 2012). Estes autores estudaram várias amostras obtidas de 49 pacientes com diabetes *mellitus*, nos quais recuperaram 147 isolados bacterianos, dos quais 43 eram espécies diferentes. Neste estudo, contrariamente ao que se verificou no nosso, o *S. aureus* foi a bactéria mais frequente, estando presente em metade das amostras.

Na nossa amostragem observámos uma pequena percentagem (20%) de amostras positiva para bactérias anaeróbias e identificámos 23 espécies de bactérias anaeróbias por cultura, as quais maioritariamente pertencem aos géneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium*, estudos realizados por vários autores apresentaram dados similares (Brook, 1989; Jousimies-Somer, 1995; Goldstein, 1996; Jousimies-Somer, 1997; Maukonen *et al.*, 2006; Nagy, 2010; Nagy *et al.*, 2015). Walter e colaboradores (2014) estudaram infeções osteoarticulares por anaeróbios e identificaram 36 espécies de bactérias, entre as quais as espécies do género *Clostridium* foram as que mais vezes estiveram associadas com fraturas abertas. Segundo o mesmo estudo, *Propionibacterium acnes* foi a espécie de anaeróbio mais frequente. Resultados de estudos retrospectivos também têm registado resultados similares aos observados no presente estudo, por exemplo, bactérias do grupo *B. fragilis* e espécies do género *Clostridium* foram as mais identificadas num estudo retrospectivo que analisou dados de 2003 a 2012 de um hospital em Madrid (Vena *et al.*, 2015).

A sensibilidade do PCRtr, determinada aquando da implementação do protocolo, para a deteção das bactérias do género *Clostridium* foi mais baixa do que as verificadas para a deteção de bactérias dos géneros *Bacteroides* e *Prevotella*. Com as condições usadas neste estudo, o PCRtr permitiu a identificação de bactérias anaeróbias dos géneros *Bacteroides*, *Clostridium* e *Prevotella* nas amostras clínicas testadas. Reconhecemos, no entanto, haver a necessidade de otimizações adicionais às que foram realizadas no protocolo inicial do PCRtr para a deteção de *Clostridium*, uma vez que a eficiência e sensibilidade foram mais baixas do que os valores reportados por Song *et al.* (2004). No nosso estudo optámos por identificar bactérias do *cluster* I, que é o grupo que engloba a maior parte das espécies clinicamente significativas (Collins *et al.*, 1994; Maukonen *et al.*, 2006). Está descrito que este género é genotipicamente diverso, pelo que é possível

que diferenças genotípicas entre as bactérias que constituam este grupo possam ter contribuído para a baixa eficiência e sensibilidade da PCRtr na sua deteção (Vos *et al.*, 2009). Por outro lado, os reagentes usados neste estudo foram diferentes relativamente ao estudo original, o que também pode ser um fator explicativo para a diferença de sensibilidade encontrada. Para a realização da PCRtr é normalmente recomendada a amplificação de uma região entre 75 pb e 200pb (QIAGEN, 2010) enquanto que, nosso caso, os *primers* utilizados para o género *Clostridium* amplificam uma região de 232pb (Song *et al.*, 2004), ligeiramente superior ao recomendado o que poderá ter contribuído para a sensibilidade obtida, o que não se verificou nos *primers* para os outros géneros em estudo. A obtenção de *primers* para identificar este género não foi tarefa fácil dado à diversidade genotípica, já anteriormente referida. Alternativamente à abordagem usada neste estudo, poder-se-á ainda otimizar reações de PCRtr *multiplex* capazes de detetar, em simultâneo, as principais espécies clinicamente significativas de *Clostridium*.

O número de amostras positivas para *Bacteroides* e *Prevotella* por PCRtr foi superior ao identificado por cultura. Para *Bacteroides*, 22 amostras foram positivas por cultura enquanto que, no PCRtr, foram detetadas 36. Da mesma forma, 12 amostras foram positivas para *Prevotella*, por cultura, enquanto que, no PCRtr, foram detetadas 28. O início da antibioterapia antes da colheita das amostras para análise poderia ser um dos fatores que permitisse explicar a diferença entre o número de amostras positivas por cultura e por PCRtr. Esta hipótese tem por base o facto de que o tratamento, ao interferir com a biologia das bactérias, também afeta o seu crescimento e consequentemente a sua identificação. A PCRtr tem como vantagem não ser influenciada pela antibioterapia prévia. No entanto, na análise dos resultados da regressão logística, verificamos que o tratamento não afetava a proporção de amostras positivas identificadas por PCRtr, mas também não afetou a cultura. Da mesma forma, noutros estudos não se observou um efeito do tratamento na viabilidade de bactérias anaeróbias (Tunney *et al.*, 2011). Em alguns casos, a resistência aos antibióticos contribui para esta situação (Schuetz, 2014). Verificamos ainda que, nas amostras líquidas o número de negativos é maior, tanto na cultura como no PCRtr. A maioria dos resultados positivos, tanto por cultura como por PCRtr, ocorreu nas amostras purulentas. Estes resultados da cultura estão de acordo com o facto de as amostras purulentas conterem inúmeros compostos redutores que ajudam a manter a viabilidade das bactérias, o que não acontece com os líquidos (Jousimies-

Somer & Finegold, 1984; Brook, 2008; Nagy, 2010). Para o PCRtr a manutenção da viabilidade não é essencial, mas os resultados obtidos são explicados com o facto de uma forma geral, a maioria das infeções por bactérias anaeróbicas originarem exsudados purulentos (Brook, 2008; Chemother, 2011).

Não existe um grupo definido de cofatores que se associem sempre com infeções por anaeróbios. Estes têm que ser identificados e geridos em cada contexto, principalmente em ambiente hospitalar. No entanto, infeções por bactérias anaeróbios na circulação sanguínea, em pacientes que receberam transplante, associam-se principalmente às mucosites (Lark *et al.*, 2001). Outros fatores como infeções pulmonares também se associam com a presença de anaeróbios (Celakovsky *et al.*, 2014). Para *C. difficile*, fatores tais como o tempo de internamento, falência dos rins e a exposição a antibióticos já foram identificados como fatores de risco num estudo realizado em hospitais universitários na China (Huang *et al.*, 2014). Outros estudos já associaram a presença de bactérias anaeróbias (*Bacteroides*) ao cancro do cólon (Yoshino *et al.*, 2012).

Na análise das amostras clínicas os valores da sensibilidade do PCRtr foram maiores para a deteção de *Bacteroides* (82%) que para *Prevotella* e *Clostridium cluster I* (75%). Os valores da sensibilidade do PCRtr para *Prevotella* são iguais aos observados para *Clostridium cluster I*, isto é, verificamos que três amostras positivas por cultura para *Prevotella* e uma para *Clostridium cluster I* foram negativas por PCRtr, relembra-se que o número de amostras analisadas para este último agente foi menor (82).

Quanto à especificidade, verificamos que o melhor valor foi o do PCRtr para *Clostridium cluster I* (100%), isto é, para este agente não foi detetada nenhuma amostras positiva por PCR que tenha sido negativa por cultura. No PCRtr para *Bacteroides* obtivemos 18 amostras positivas por PCRtr que tinham sido negativas por cultura, o que contribuiu para a diminuição da especificidade (87%). Das três amostras enviadas para sequenciação não foi possível obter fluorograma com qualidade suficiente para realizar a identificação do microrganismo presente. As restantes amostras não tinham quantidade de extrato de DNA suficiente para realizar esta confirmação, pelo que não podemos descartar estes falsos positivos. Da mesma forma, 19 amostras foram positivas por PCRtr e negativas por cultura, para o género *Prevotella*, amostras consideradas como falsas positivas, que determinam a baixa especificidade deste PCRtr.

De acordo com a análise da especificidade teórica realizada para os *primers* da *Prevotella* verificamos que existe afinidade para algumas bactérias do género *Fusobacterium*. Para confirmar que os falsos positivos obtidos no PCRtr não resultavam da amplificação de bactérias do género *Fusobacterium* decidimos repetir o PCRtr, em 16 amostras, e sequenciar o amplificado usando o método de Sanger. Os resultados obtidos permitem afirmar que o nosso PCRtr para *Prevotella* foi específico, à exceção de uma amostra, cujo fluorograma não apresentou qualidade suficiente para ser analisado, as restantes amostras permitiram confirmar a presença de *Prevotella*, o que vem demonstrar que não se tratavam de falsos positivos do PCRtr.

Na literatura encontramos estudos semelhantes ao nosso, Boutaga e colaboradores compararam a deteção por PCRtr com a identificação por cultura de cinco anaeróbios (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium* spp) tendo obtido valores de sensibilidade de 91-99%, especificidade de 28-90%, VPP de 71-98% e VPN de 71-97 (Boutaga *et al.*, 2005). Num outro estudo, os autores comparam os resultados obtidos por PCR, em combinação com a sequenciação, e os resultados da cultura tendo obtido uma sensibilidade de 74%, uma especificidade de 99%, um VPP e um VPN de 96 e 97%, respetivamente (Rantakokko-Jalava *et al.*, 2000). O nosso estudo apresentou valores mais próximos dos observados neste último, com a exceção dos valores VPP, que foram mais baixos para os géneros *Bacteroides* e *Prevotella*, 50% e 31%, respetivamente.

Resultados positivos por PCRtr e negativos por cultura, considerados como falsos positivos, podem ser resultado de contaminações no processo de amplificação, reações cruzadas com outras bactérias, deteção de bactérias mortas ou de concentrações abaixo do nível detetado pela cultura ou ainda, devido a bactérias não cultiváveis. Em relação à contaminação, no presente estudo foram tomadas precauções durante o processamento das extrações e preparação da mistura de amplificação para prevenir este tipo de situação, para além de que não foi observada qualquer amplificação nos controlos negativos. Foi ainda realizada, periodicamente, a extração de água em paralelo com as amostras, de modo a tentar descartar a hipótese de contaminação dos reagentes de extração. Por outro lado, todas as amostras positivas por PCRtr e negativas por cultura foram confirmadas com uma nova extração e sessão de PCRtr. Também podemos excluir a possibilidade de reações cruzadas com outras bactérias, dado que o *primers* e

sondas mostraram ser específicos no teste de especificidade. Ainda é de salientar que 15 amostras consideradas falsos positivos para *Prevotella* confirmaram, por sequenciação, a identificação para este género.

Problemas na colheita e transporte, como por exemplo, a não observação dos cuidados necessários para manter a viabilidade bacteriana, falha no processamento da cultura por anaerobiose, escolha inadequada dos meios de cultura e problemas na manutenção da atmosfera de anaerobiose podem ser responsável por falsos negativos na cultura (Dowell & Hawkins, 1974; Chemother, 2011) e, consequentemente, pela errada classificação como falsos positivos com a técnica de PCRtr.

Estudos sugerem que um número considerável de anaeróbios com significado clínico não são detetados ou permanecem mal identificados devido apenas ao uso exclusivo das técnicas fenotípicas e à sua complexidade. Num estudo, que comparou a cultura com a sequenciação do gene 16S rDNA, concluiu-se que 20% das espécies de *Bacteroides* e 36% das de *Prevotella* não foram identificados ou foram mal identificados usando métodos convencionais. Num outro estudo, que analisou 20 estirpes de bacilos de Gram positivo, utilizando a sequenciação e vários kits de identificação, concluiu que todas foram identificadas por sequenciação, duas por Vitek ANI; sete por RapID ANA II, seis por API 20A e 13 por MicroSeq (Citron, 2012). Vários outros estudos mostraram que a correta identificação usando os *cards* Vitek ANC, varia de 51 a 95%, deixando, portanto, algumas espécies mal identificadas ou por identificar (Lee *et al.*, 2011). Um outro factor que pode interferir com a identificação por cultura é a formação de biofilme, o que é comum em feridas infetadas (Han *et al.*, 2011).

Os resultados negativos por PCRtr e positivos por cultura (considerados falsos negativos) podem resultar de uma incompleta/incorrecta extração. Esta hipótese não nos parece provável dado que tivemos duas amostras que foram positivas por cultura para os dois géneros, *Bacteroides* e *Prevotella* e por PCRtr obtivemos positividade para um género, numa amostra a positividade foi para *Bacteroides* e na outra foi para *Prevotella*. Para além desta situação, houve uma amostra que deu positiva por PCRtr para *Bacteroides*, bactéria que não tinha sido identificado por cultura (com esta metodologia tinha sido identificada *Prevotella*). Estes resultados suportam a nossa hipótese, dado que ambas as bactérias são de Gram negativo e por isso a sua extração deverá ocorrer de



forma semelhante, pelo que não deverá ser este passo o responsável pelo acontecido. Temos, no entanto, que referir que das seis amostras que deram resultados falsos negativos, em três não foi identificado nenhum destes géneros por PCRtr.

Outra hipótese para estes falsos negativos pode dever-se à dificuldade em homogeneizar as amostras, principalmente as purulentas e problemas inerentes à reação de amplificação devido a inibição por excesso de DNA ou por presença de inibidores (Song, 2005; Melendez *et al.*, 2010). Por outro lado, pode-se observar que das sete amostras que apresentaram resultados falsos negativos, considerando os três géneros em estudo, seis eram amostras purulentas. Estas amostras apresentam, muitas vezes, sangue resultando em quantidades significativas de inibidores da PCR como a hemoglobina (Han *et al.*, 2011) e, por outro lado, poderá ter acontecido inibição da PCRtr, devido à grande quantidade de DNA humano presente nestas amostras (Yamashita *et al.*, 1994; Han *et al.*, 2011).

Concluimos que a metodologia testada neste estudo permite uma rápida identificação de bactérias anaeróbias dos géneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium cluster I* por PCRtr e, portanto, esta pode ser usada como auxiliar da técnica de cultura no diagnóstico e tratamento de infeções causadas por estes anaeróbios. Os géneros *Bacteroides*, *Prevotella* e *Clostridium*, que compreendem as principais espécies de relevância clínica, foram as bactérias mais isoladas por cultura. Os resultados de PCRtr juntamente com os de sequenciação por Sanger, permitiu-nos ainda concluir que a identificação de *Bacteroides* e *Prevotella*, mas não de *Clostridium*, por métodos moleculares é mais sensível de que por cultura. Concluimos também que, o tratamento não afetou a identificação de bactérias anaeróbias por nenhum dos métodos utilizados neste estudo. As amostras de consistência líquida foi o grupo onde foi identificado um menor número de bactérias anaeróbias. A especificidade do PCRtr não foi de 100% para deteção de *Bacteroides* e *Prevotella*, uma vez que varias amostras foram positivas por PCRtr e não por cultura, embora a possibilidade de se tratar de falsos-negativos por cultura seja a hipótese mais provável.

Considerando que o diagnóstico correto das bactérias anaeróbias envolvidas nos processos infecciosos é fundamental para a avaliação da doença e para a implementação do tratamento adequado, há todo o interesse em implementar uma técnica de PCR em

tempo real no diagnóstico de rotina, isto porque, é um método rápido sensível, específico e que permite a detecção de microrganismos mesmo quando a sua viabilidade esta comprometida, podendo assim complementar o método de referência, a cultura.

## 5. Referências Bibliográficas

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Bamforth, C.W. 2017. Progress in Brewing Science and Beer Production. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, **8**, annurev-chembioeng-060816-101450. doi:10.1146/annurev-chembioeng-060816-101450.
- Bartlett, J.G. 2002. An Update on Mixed Aerobic and Anaerobic Infections. *Advanced Studies in Medicine*, **2**, 104–109.
- Bharadwaj, R. 2012. Anaerobic microbiology: Time to rejuvenate. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **30**, 3. doi:10.4103/0255-0857.93013.
- Boutaga, K., Winkelhoff, A.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. & Savelkoul, P.H.M. 2005. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **45**, 191–199. doi:10.1016/j.femsim.2005.03.011.
- Brook, I. 1989. Anaerobic Bacterial Bacteremia: 12-Year Experience in Two Military Hospitals. *Journal of Infectious Diseases*, **160**, 1071–1075. doi:10.1093/infdis/160.6.1071.
- Brook, I. 2008. Anaerobic infections: diagnosis and management. *Anaerobic infections: diagnosis and management*. Informa Healthcare, 417 pp.
- Brook, I. 2002. Cutaneous and subcutaneous infections in newborns due to anaerobic bacteria. *Journal of Perinatal Medicine*, **30**. doi:10.1515/JPM.2002.028.
- Burnham, K.P. & Anderson, D.R. eds. 2004. Model Selection and Multimodel Inference. *Model Selection and Multimodel Inference*. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/b97636.
- Carvalho, F. 2016. Detecção de Bacteroides e Prevotella por PCRtr em amostras clínicas. *Detecção de Bacteroides e Prevotella por PCRtr em amostras clínicas*. Universidade Nova de Lisboa, 77 pp.
- Celakovsky, P., Kalfert, D., Tucek, L., Mejzlik, J., Kotulek, M., Vrbacky, A., Matousek, P., Stanikova, L., Hoskova, T. & Pasz, A. 2014. Deep neck infections: risk factors for mediastinal extension. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, **271**, 1679–1683. doi:10.1007/s00405-013-2651-5.
- Chemother, J.I. 2011. Chapter 1-2. Anaerobic infections (general): testing anaerobic infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **17**, 13–25. doi:10.1007/s10156-010-0132-y.
- Citron, D.M. 2012. Pre-molecular identification – Ignorance was Bliss? *Anaerobe*, **18**, 189–191. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.11.003.
- Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H. & Farrow, J.A.E. 1994. The Phylogeny of the Genus Clostridium: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**, 812–826. doi:10.1099/00207713-44-4-812.
- Couto, S.R. & Sanromán, M.Á. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *Journal of Food Engineering*, **76**, 291–302.

- doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022.
- Decker, K., Jungermann, K. & Thauer, R.K. 1970.** Energy Production in Anaerobic Organisms. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **9**, 138–158. doi:10.1002/anie.197001381.
- Desforges, J.F. & Eisenstein, B.I. 1990.** The Polymerase Chain Reaction. *New England Journal of Medicine*, **322**, 178–183. doi:10.1056/NEJM199001183220307.
- Dohrmann, A.B., Walz, M., Löwen, A. & Tebbe, C.C. 2015.** Clostridium cluster I and their pathogenic members in a full-scale operating biogas plant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**, 3585–3598. doi:10.1007/s00253-014-6261-y.
- Dowell, V.R. & Hawkins, T.M. (Theo M.). 1928-. 1974.** Laboratory methods in anaerobic bacteriology; CDC laboratory manual Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/7666> [Accessed September 17, 2017].
- Edmiston, C.E., Krepel, C.J., Seabrook, G.R. & Jochimsen, W.G. 2002.** Anaerobic infections in the surgical patient: microbial etiology and therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **35**, S112-8. doi:10.1086/341931.
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., ... Smith, T.F. 2006.** Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, **19**, 165–256. doi:10.1128/CMR.19.1.165-256.2006.
- Finegold, S.M. 1993.** A Century of Anaerobes: A Look Backward and a Call to Arms. *Clinical Infectious Diseases*, **16**, S453–S457. doi:10.1093/clinids/16.Supplement\_4.S453.
- Finegold, S.M. 1995.** Anaerobic infections in humans: an overview. *Anaerobe*, **1**, 3–9 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887500>.
- Finegold, S.M. 1997.** Perspective on Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, **25**, S251–S253. doi:10.1086/516233.
- Finegold, S.M. & Jousimies-Somer, H. 1997.** Recently described clinically important anaerobic bacteria: medical aspects. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **25 Suppl 2**, S88-93 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310641> [Accessed January 26, 2017].
- Finegold, S.M. & Wexler, H.M. 1996a.** Present Status of Therapy for Anaerobic Infections. *Clinical Infectious Diseases*, **23**, S9–S14. doi:10.1093/clinids/23.Supplement\_1.S9.
- Finegold, S.M. & Wexler, H.M. 1996b.** Present Status of Therapy for Anaerobic Infections. *Clinical Infectious Diseases*, **23**, S9–S14. doi:10.1093/clinids/23.Supplement\_1.S9.
- Finegold, S.M. & Wexler, H.M. 1996c.** Present studies of therapy for anaerobic infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **23 Suppl 1**, S9-14. doi:10.1093/CLINIDS/23.SUPPLEMENT\_1.S9.
- Goldstein, E.J. 1996.** Anaerobic bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **23 Suppl 1**, S97-101 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8953114> [Accessed April 20, 2017].

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 95–108. doi:10.1038/nrmicro821.
- Halstead, D.C., Abid, J., Sloan, L., Meza, D., Ramsey-Walker, D. & Hata, D.J. 2016. A multi-laboratory comparison of two molecular methods for the detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *The Journal of Infection in Developing Countries*, **10**, 62. doi:10.3855/jidc.6634.
- Han, A., Zenilman, J.M., Melendez, J.H., Shirliff, M.E., Agostinho, A., James, G., Stewart, P.S., ... Lazarus, G.S. 2011. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, **19**, 532–541. doi:10.1111/j.1524-475X.2011.00720.x.
- Harayama, S. & Kasai, H. 2006. Bacterial Phylogeny Reconstruction from Molecular Sequences. In *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 105–139. doi:10.1007/978-3-540-31292-5\_5.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R. & Widdel, F. 1998. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**, 459–473. doi:10.1111/j.1574-6976.1998.tb00381.x.
- Hentges, D.J. 1996. Anaerobes: General Characteristics. In Baron, S., ed. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Holm, S. 1979. A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, **6**, 65–70. doi:10.2307/4615733.
- Huang, H., Wu, S., Chen, R., Xu, S., Fang, H., Weintraub, A. & Nord, C.E. 2014. Risk factors of *Clostridium difficile* infections among patients in a university hospital in Shanghai, China. *Anaerobe*, **30**, 65–69. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.08.015.
- Ivey, M., Massel, M. & Phister, T.G. 2013. Microbial Interactions in Food Fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*, **4**, 141–162. doi:10.1146/annurev-food-022811-101219.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. & Daszak, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, **451**, 990–993. doi:10.1038/nature06536.
- Jousimies-Somer, H. 1997. Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **25 Suppl 2**, S78-87 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9310640> [Accessed December 27, 2016].
- Jousimies-Somer, H. 1995. Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristics of pigmented anaerobic gram-negative rods. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **20 Suppl 2**, S187-91 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7548548> [Accessed December 28, 2016].
- Jousimies-Somer, H.R. & Finegold, S.M. 1984. Problems Encountered in Clinical Anaerobic Bacteriology. *Clinical Infectious Diseases*, **6**, S45–S50. doi:10.1093/clinids/6.Supplement\_1.S45.
- Knight, I.T. 2000. Molecular Genetic Methods for Detection and Identification of Viable but Nonculturable Microorganisms. In *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Boston, MA: Springer US, 77–85. doi:10.1007/978-1-4757-0271-2\_6.

- Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W. & Whitman, W.B. 2010. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W. & Whitman, W.B., eds. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-68572-4.
- Lagier, J.-C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M. & Raoult, D. 2015. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, **28**, 208–236. doi:10.1128/CMR.00110-14.
- Lark, R.L., McNeil, S.A., VanderHyde, K., Noorani, Z., Uberti, J. & Chenoweth, C. 2001. Risk Factors for Anaerobic Bloodstream Infections in Bone Marrow Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, **33**, 338–343. doi:10.1086/322595.
- Layton, A., McKay, L., Williams, D., Garrett, V., Gentry, R. & Sayler, G. 2006. Development of Bacteroides 16S rRNA Gene TaqMan-Based Real-Time PCR Assays for Estimation of Total, Human, and Bovine Fecal Pollution in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 4214–4224. doi:10.1128/AEM.01036-05.
- Lee, E.H.L., Degener, J.E., Welling, G.W. & Veloo, A.C.M. 2011. Evaluation of the Vitek 2 ANC Card for Identification of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **49**, 1745–1749. doi:10.1128/JCM.02166-10.
- Levinson, W. 2014. Review of Medical Microbiology and Immunology. *Review of Medical Microbiology and Immunology*. 13th ed. McGraw-Hill Medical, 800 pp. Available at: <https://www.amazon.com/Medical-Microbiology-Immunology-Eleventh-Science/dp/0071700285>.
- Liu, C.-Y., Huang, Y.-T., Liao, C.-H., Yen, L.-C., Lin, H.-Y. & Hsueh, P.-R. 2008. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and Bacteroides fragilis isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **52**, 3161–3168. doi:10.1128/AAC.00355-08.
- Maheaswari, R., Kshirsagar, J.T. & Lavanya, N. 2016. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*, **20**, 128–135. doi:10.4103/0972-124X.176391.
- Marik, P.E. 2001. Aspiration Pneumonitis and Aspiration Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, **344**, 665–671. doi:10.1056/NEJM200103013440908.
- Martin, F.E., Nadkarni, M.A., Jacques, N.A. & Hunter, N. 2002. Quantitative Microbiological Study of Human Carious Dentine by Culture and Real-Time PCR: Association of Anaerobes with Histopathological Changes in Chronic Pulpitis. *Journal of Clinical Microbiology*, **40**, 1698–1704. doi:10.1128/JCM.40.5.1698-1704.2002.
- Maukonen, J., Matto, J., Satokari, R., Soderlund, H., Mattila-Sandholm, T. & Saarela, M. 2006. PCR DGGE and RT-PCR DGGE show diversity and short-term temporal stability in the Clostridium coccoides - Eubacterium rectale group in the human intestinal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, **58**, 517–528. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00179.x.
- Mayer, F. & Müller, V. 2014. Adaptations of anaerobic archaea to life under extreme energy limitation. *FEMS Microbiology Reviews*, **38**, 449–472. doi:10.1111/1574-



- 6976.12043.
- Melendez, J.H., Frankel, Y.M., An, A.T., Williams, L., Price, L.B., Wang, N.-Y., Lazarus, G.S. & Zenilman, J.M. 2010.** Real-time PCR assays compared to culture-based approaches for identification of aerobic bacteria in chronic wounds. *Clinical Microbiology and Infection*, **16**, 1762–1769. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03158.x.
- Mendes, J.J., Marques-Costa, A., Vilela, C., Neves, J., Candeias, N., Cavaco-Silva, P. & Melo-Cristino, J. 2012.** Clinical and bacteriological survey of diabetic foot infections in Lisbon. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **95**, 153–161. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.001.
- Mesbah, N.M. & Wiegel, J. 2008.** Life at Extreme Limits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1125**, 44–57. doi:10.1196/annals.1419.028.
- Morris, J.G. 1975.** The Physiology of Obligate Anaerobiosis. *Advances in Microbial Physiology*, **12**, 169–246. doi:10.1016/S0065-2911(08)60282-9.
- Murphy, E.C. & Frick, I.-M. 2013.** Gram-positive anaerobic cocci – commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, **37**, 520–553. doi:10.1111/1574-6976.12005.
- Nagy, E. 2010.** Anaerobic Infections. *Drugs*, **70**, 841–858. doi:10.2165/11534490-000000000-00000.
- Nagy, E., Conrads, G. & KÖnÖnen, E. 2015.** Bacteroides , Porphyromonas , Prevotella , Fusobacterium , and Other Anaerobic Gram-Negative Rods\*. In *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. American Society of Microbiology, 967–993. doi:10.1128/9781555817381.ch54.
- Nozhevnikova, A.N., Kotsyurbenko, O.R. & Parshina, S.N. 1999.** Anaerobic manure treatment under extreme temperature conditions. *Water Science and Technology*, **40**.
- O'Connor, J., Vjecha, M.J., Phillips, A.N., Angus, B., Cooper, D., Grinsztejn, B., Lopardo, G., ... Lundgren, J.D. 2017.** Effect of immediate initiation of antiretroviral therapy on risk of severe bacterial infections in HIV-positive people with CD4 cell counts of more than 500 cells per  $\mu\text{L}$ : secondary outcome results from a randomised controlled trial. *The Lancet HIV*, **4**, e105–e112. doi:10.1016/S2352-3018(16)30216-8.
- Patel, J. 2001.** 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, **6**, 313–321. doi:10.1054/modi.2001.29158.
- Pfaller, M.A., Richter, S.S., Funke, G., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Carroll, K.C. & Warnock, D.W. eds. 2015.** Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. American Society of Microbiology. doi:10.1128/9781555817381.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. 2004.** Microbiología. *Microbiología*. McGraw-Hil.
- QIAGEN. 2010.** Sample & Assay Technologies Critical Factors for Successful Real-Time PCR. Sample & Assay Technologies Critical Factors for Successful Real-Time PCR, 64 pp. Available at: <http://www.genequantification.com/qiagen-qpcr-sample-assay-tech-guide-2010.pdf> [Accessed October 20, 2017].
- R Core Team. 2017.** R: A language and environment for statistical computing Available at: <http://www.r-project.org/>.

- Rantakokko-Jalava, K., Nikkari, S., Jalava, J., Eerola, E., Skurnik, M., Meurman, O., Ruuskanen, O., ... Kotilainen, P. 2000.** Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *Journal of clinical microbiology*, **38**, 32–39 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618059> [Accessed January 8, 2018].
- Rayan, K. & Ray, G. 2004.** Sherris Medical Microbiology: An introduction to Infectious Diseases. *Sherris Medical Microbiology: An introduction to Infectious Diseases*. 4th ed. McGraw Hill.
- Rolfe, R.D., Hentges, D.J., Campbell, B.J. & Barrett, J.T. 1978.** Factors related to the oxygen tolerance of anaerobic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, **36**, 306–313 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/697363> [Accessed October 19, 2016].
- Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F.L. 2013.** The prokaryotes: prokaryotic biology and symbiotic associations. *The prokaryotes: prokaryotic biology and symbiotic associations*. Springer Reference, 607 pp.
- Rosselló-Mora, R. 2006.** DNA-DNA Reassociation Methods Applied to Microbial Taxonomy and Their Critical Evaluation. In *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 23–50. doi:10.1007/978-3-540-31292-5\_2.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. 1985.** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*, **230**, 1350–1354 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2999980>.
- Schuetz, A.N. 2014.** Antimicrobial Resistance and Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, **59**, 698–705. doi:10.1093/cid/ciu395.
- Shah, H.N. & Collins, M.D. 1989.** Proposal To Restrict the Genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and Closely Related Species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **39**, 85–87.
- Shah, H.N. & Gharbia, S.E. 1992.** Biochemical and Chemical Studies on Strains Designated *Prevotella intermedia* and Proposal of a New Pigmented Species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**, 542–546. doi:10.1099/00207713-42-4-542.
- Siegel, S.J. & Weiser, J.N. 2015.** Mechanisms of Bacterial Colonization of the Respiratory Tract. *Annual Review of Microbiology*, **69**, 425–444. doi:10.1146/annurev-micro-091014-104209.
- Snydman, D.R., Jacobus, N. V., McDermott, L.A., Golan, Y., Hecht, D.W., Goldstein, E.J.C., Harrell, L., ... Gorbach, S.L. 2010.** Lessons Learned from the Anaerobe Survey: Historical Perspective and Review of the Most Recent Data (2005–2007). *Clinical Infectious Diseases*, **50**, S26–S33. doi:10.1086/647940.
- Song, Y. 2005.** PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*, **11**, 79–91. doi:10.1016/j.anaerobe.2004.10.006.
- Song, Y., Liu, C. & Finegold, S.M. 2004.** Real-Time PCR Quantitation of Clostridia in Feces of Autistic Children. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 6459–6465. doi:10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004.
- Summanen, P. 1993.** Recent taxonomic changes for anaerobic gram-positive and selected gram-negative organisms. *Clinical infectious diseases: an official*

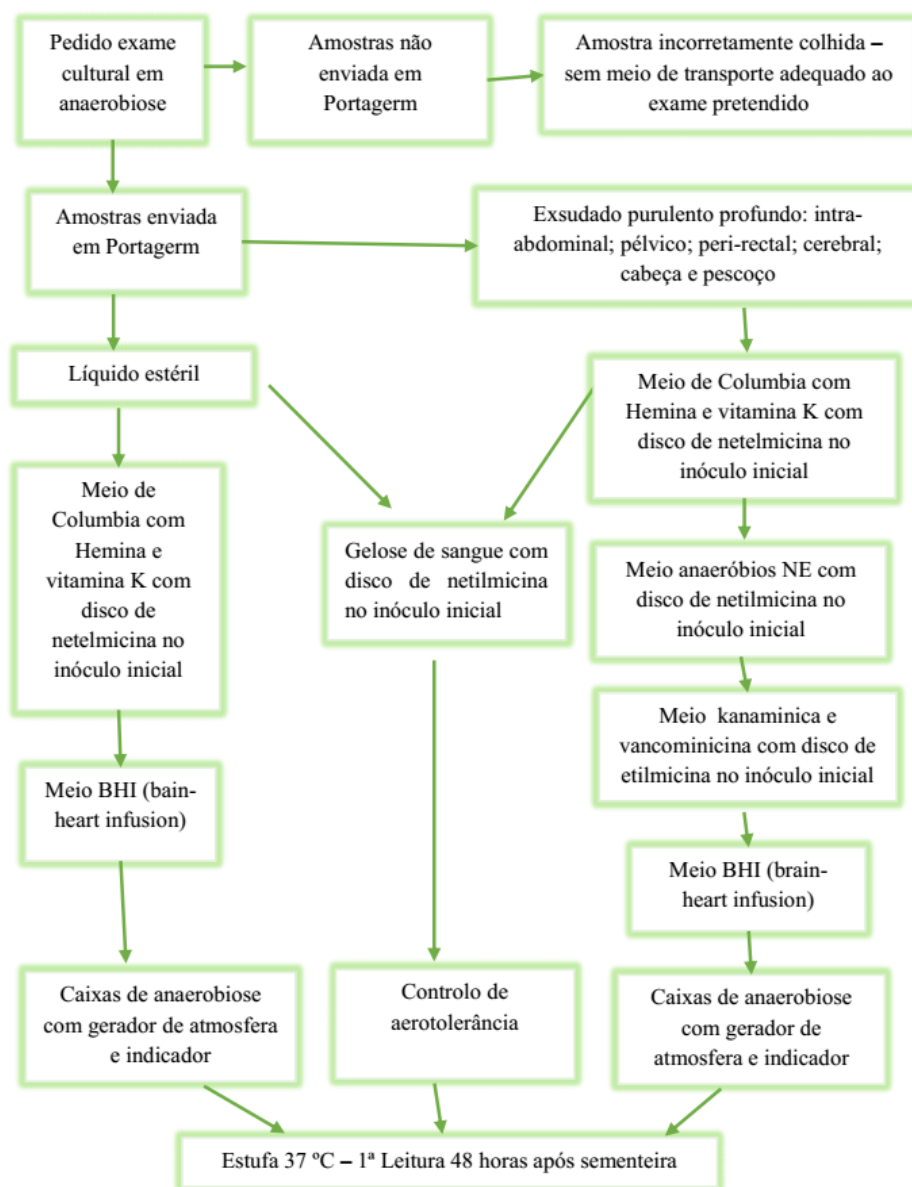


- publication of the Infectious Diseases Society of America, **16 Suppl 4**, S168-74 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8324113> [Accessed December 28, 2016].
- Thauer, R.K., Jungermann, K. & Decker, K. 1977.** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews*, **41**, 809.
- Tindall, B.J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W. & Kämpfer, P. 2010.** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**, 249–266. doi:10.1099/ijls.0.016949-0.
- Tong, J., Liu, C., Summanen, P., Xu, H. & Finegold, S.M. 2011.** Application of quantitative real-time PCR for rapid identification of *Bacteroides fragilis* group and related organisms in human wound samples. *Anaerobe*, **17**, 64–68. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.03.004.
- Towner, K.J. & Cockayne, A. 1993.** Molecular Methods for Microbial Identification and Typing. *Molecular Methods for Microbial Identification and Typing*. Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-1506-3.
- Tunney, M.M., Klem, E.R., Fodor, A.A., Gilpin, D.F., Moriarty, T.F., McGrath, S.J., Muhlebach, M.S., ... Wolfgang, M.C. 2011.** Use of culture and molecular analysis to determine the effect of antibiotic treatment on microbial community diversity and abundance during exacerbation in patients with cystic fibrosis. *Thorax*, **66**, 579–584. doi:10.1136/thx.2010.137281.
- Urbán, E. 2012.** Five-year retrospective epidemiological survey of anaerobic bacteraemia in a University Hospital and Review of the Literature. *European Journal of Microbiology and Immunology*, **2**, 140–147. doi:10.1556/EuJMI.2.2012.2.7.
- Valasek, M.A. 2005.** The power of real-time PCR. *AJP: Advances in Physiology Education*, **29**, 151–159. doi:10.1152/advan.00019.2005.
- Vaught, J.B. & Henderson, M.K. 2011.** Biological sample collection, processing, storage and information management. *IARC scientific publications*, 23–42 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22997855> [Accessed January 7, 2018].
- Vena, A., Muñoz, P., Alcalá, L., Fernandez-Cruz, A., Sanchez, C., Valerio, M. & Bouza, E. 2015.** Are incidence and epidemiology of anaerobic bacteremia really changing? *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **34**, 1621–1629. doi:10.1007/s10096-015-2397-7.
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. & Whitman, W. 2009.** Systematic Bacteriology. *Systematic Bacteriology*. Whitman, W.B., ed. New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-0-387-68489-5.
- Walter, G., Vernier, M., Pinelli, P.O., Million, M., Coulange, M., Seng, P. & Stein, A. 2014.** Bone and joint infections due to anaerobic bacteria: an analysis of 61 cases and review of the literature. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **33**, 1355–1364. doi:10.1007/s10096-014-2073-3.
- Wells, C.L. & Wilkins, T.D. 1996.** Anaerobic Cocci. In Baron S, ed. *Medical Microbiology*. Texas: University of Texas Medical Branch. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413335> [Accessed March 5, 2017].
- Wexler, H.M. 2007.** *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical microbiology reviews*, **20**, 593–621. doi:10.1128/CMR.00008-07.

- Willis, A.T. 1977.** Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice. *Anaerobic Bacteriology: Clinical and Laboratory Practice*. Elsevier Science, 664 pp. Available at: [https://books.google.pt/books?id=TKk5AwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?id=TKk5AwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false) [Accessed November 22, 2017].
- Yamashita, Y., Kohno, S., Koga, H., Tomono, K. & Kaku, M. 1994.** Detection of *Bacteroides fragilis* in clinical specimens by PCR. *Journal of clinical microbiology*, **32**, 679–683 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8195378> [Accessed January 11, 2018].
- Yang, S. & Rothman, R.E. 2004.** PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet Infectious Diseases*, **4**, 337–348. doi:10.1016/S1473-3099(04)01044-8.
- Yoshino, Y., Kitazawa, T., Ikeda, M., Tatsuno, K., Yanagimoto, S., Okugawa, S., Ota, Y. & Yotsuyanagi, H. 2012.** Clinical features of *Bacteroides* bacteremia and their association with colorectal carcinoma. *Infection*, **40**, 63–67. doi:10.1007/s15010-011-0159-8.

## 6. Anexos

**Anexo 1.** Fluxograma de processamento de anaeróbios no Hospital Egas Moniz. (Dr. Elsa Gonçalves).



---

## **Anexo 2. Originais dos protocolos de extração utilizados neste estudo.**

### **Protocolo de Tecido (*QIAamp DNA Mini Kit*) alterado utilizado na fase de otimização.**

1. Pipetar **200µL** da amostra para um microtubo de 1,5mL ou 2mL esterilizado e adicionar 180µL de tampão ATL

2. Adicionar 20µL de Proteinase K, agitar no vortex, e incubar a 56°C até se obter lise completa da amostra. Durante a incubação agitar 2 a 3 vezes para ajudar a lise.

O tempo de lise varia dependendo do tipo da amostra processado. A lise é geralmente completa em 1-3h consoante a consistência da amostra.

3. Fazer um spin da amostra para remover as gotas do interior da tampa, e adicionar 200µL de Tampão AL. Agitar novamente no vortex durante 15 s, e incubar a 70°C durante 10 min e voltar a fazer spin.

4. Adicionar 200µL de etanol (96-100%) à amostra, e agitar no vortex durante 15 s e fazer um spin.

5. Cuidadosamente aplicar a mistura (incluindo o precipitado) à coluna QIAamp Spin (num tubo de recolha de 2mL) sem molhar o rebordo. Fechar a tampa e centrifugar a 6000g (8000 rpm) durante 1 min. Colocar a coluna de centrifugação QIAamp num tubo de recolha limpo de 2mL (fornecido) e deitar fora o tubo que contém o filtrado.

6. Abrir a coluna com cuidado e adicione 500µL de tampão AW1 sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar a 6000g (8000 rpm) durante 1 min. Coloque a Coluna QIAamp num tubo de recolha limpo de 2mL (fornecido) e deite fora o tubo de recolha que contém o filtrado.

7. Abrir a coluna QIAamp Spin e adicionar 500µL de tampão AW2. Fechar a tampa e centrifugar à velocidade máxima (20.000 x g, 14.000 rpm) durante 3 min.

8. Colocar a coluna de centrifugação QIAamp num novo tubo de recolha de 2mL (não fornecido) e deitar fora o tubo de recolha que contém o filtrado. Centrifugar a 20.000g (14.000 rpm) durante 1 min.

9. Colocar a Coluna QIAamp num tubo de microcentrífuga limpo de 1,5mL (não fornecido) e descartar o tubo de coleta contendo o filtrado. Abrir a coluna QIAamp Spin cuidadosamente e adicionar 50µL de Tampão AE ou água destilada. Incubar à temperatura ambiente durante 5 min, e depois centrifugar a 6000g (8000 rpm) durante 3 min.
10. Efetuar uma segunda eluição com os 50 µL do eluato do passo anterior.
11. Centrifugue à velocidade máxima durante 3 minutos. Remover e descartar a coluna.
12. Armazenar o DNA a -20°C.

**Protocolo de Tecido (QIAamp DNA Mini Kit) – protocolo original.**

1. Cortar até 25mg de tecido em pequenos pedaços, colocar num tubo de microcentrífuga de 1,5mL e adicionar 180µL de Tampão ATL.
2. Adicionar 20µL de proteinase K, misturar por vortex, e incubar a 56°C até o tecido ser completamente lisado. Vortex ocasionalmente durante a incubação para dispersar a amostra, ou colocá-lo em um banho de água de agitação ou em uma plataforma de balanço.

**Nota:** A proteinase K deve ser utilizada. QIAGEN A protéase reduziu a atividade na presença de Tampão ATL.

O tempo de lise varia dependendo do tipo de tecido processado. A lise é geralmente completa em 1-3 h. A lise durante a noite é possível e não influencia a preparação. De modo a assegurar uma lise eficiente, deve ser utilizado um banho-maria de agitação ou uma plataforma oscilante.

Se não estiver disponível, recomenda-se o vortex 2-3 vezes por hora durante a incubação.

**3.** Centrifugar rapidamente o tubo de microcentrífuga de 1,5mL para remover as gotas do interior da tampa. Continuar com o passo 3a, ou se for necessário DNA genómico isento de RNA, continuar com o passo 3b.

**3a.** Adicionar 200µL de Tampão AL à amostra, misturar por vórtex pulsado durante 15 s, e incubar a 70°C durante 10 min. Centrifugar rapidamente o tubo de microcentrífuga de 1,5 mL para remover as gotas do interior da tampa.

**3b.** Primeiro adicionar 4µL de RNase A (100 mg/mL), misturar por vórtex pulsado durante 15s, e incubar durante 2 min à temperatura ambiente. Centrifugar rapidamente o tubo de microcentrífuga de 1,5mL para remover as gotas do interior da tampa antes de adicionar 200µL de Tampão AL à amostra. Misturar novamente por vórtex pulsado durante 15 s, e incubar a 70°C durante 10 min.

Centrifugar rapidamente o tubo de microcentrífuga de 1,5mL para remover as gotas do interior da tampa. É essencial que a amostra e o tampão AL sejam cuidadosamente misturados para se obter uma solução homogénea.

Pode formar-se um precipitado branco por adição de tampão AL. Na maior parte dos casos, este dissolver-se-á durante a incubação a 70°C. O precipitado não interfere com o procedimento QIAamp ou com qualquer aplicação subsequente.

**4.** Adicionar 200µL de etanol (96-100%) à amostra, e misturar por vórtex pulsado durante 15 s.

Após a mistura, centrifugar rapidamente o tubo de microcentrífuga de 1,5mL para remover as gotas do interior da tampa.

É essencial que a amostra, o tampão AL e o etanol sejam cuidadosamente misturados para se obter uma solução homogénea.

Pode formar-se um precipitado branco por adição de etanol. É essencial aplicar todo o precipitado na coluna de centrifugação QIAamp. Este precipitado não interfere com o procedimento QIAamp ou com qualquer aplicação subsequente.

Não use álcoois além do etanol, pois isso pode resultar em rendimentos reduzidos.

5. Cuidadosamente aplicar a mistura do passo 4 (incluindo o precipitado) à coluna QIAamp Spin (num tubo de recolha de 2mL) sem molhar o bordo. Fechar a tampa e centrifugar a 6000g (8000 rpm) durante 1 min. Coloque a coluna de centrifugação QIAamp num tubo de recolha limpo de 2mL (fornecido) e deite fora o tubo que contém o filtrado.

Feche cada coluna de rotação para evitar a formação de aerossóis durante a centrifugação.

É essencial aplicar todo o precipitado na coluna de centrifugação QIAamp.

A centrifugação é realizada a 6000g (8000 rpm) para reduzir o ruído.

A centrifugação a toda velocidade não afetará o rendimento ou a pureza do DNA. Se a solução não passar completamente pela membrana, centrifugue de novo a uma maior velocidade até que toda a solução tenha passado.

6. Abrir com cuidado a coluna giratória QIAamp e adicionar 500µL de tampão AW1 sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugue a 6000g (8000 rpm) durante 1 min.

Colocar a Coluna Giratória QIAamp num tubo de recolha limpo de 2mL (fornecido) e deitar fora o tubo de recolha que contém o filtrado.

7. Abrir com cuidado a coluna QIAamp Spin e adicionar 500µL de tampão AW2 sem molhar a borda. Fechar a tampa e centrifugar à velocidade máxima (20.000g, 14.000 rpm) durante 3 min. Continuar diretamente com o passo 8, ou para eliminar qualquer possibilidade de transferência de Buffer AW2 possível, execute o passo 7a e continue com o passo 8.

**Nota:** O tampão residual AW2 no eluato pode causar problemas nas aplicações jusante. Alguns rotores de centrífuga podem vibrar após a desaceleração, do fluxo, que contém Buffer AW2, entrando em contato com a coluna QIAamp Spin. A remoção da coluna giratória QIAamp e do tubo coletor do rotor também pode fazer com que o fluxo entre em contato com a coluna QIAamp Spin. Nestes casos, a etapa opcional 7a deve ser realizada.

**7a.** (Opcional): colocar a coluna de centrifugação QIAamp num novo tubo de recolha de 2mL (não fornecido) e deitar fora o tubo de recolha que contém o filtrado. Centrifugar a 20.000g (14.000 rpm) durante 1 min.

**8.** Colocar a Coluna Giratória QIAamp num tubo de microcentrífuga limpo de 1,5mL (não fornecido) e descarte o tubo de coleta contendo o filtrado. Abra a coluna QIAamp Spin cuidadosamente e adicione 200µL de Tampão AE ou água destilada. Incubar à temperatura ambiente durante 1 min, e depois centrifugar a 6000g (8000 rpm) durante 1 min.

**9.** Repita o passo 8.

Uma incubação de 5 min da coluna QIAamp Spin carregada com tampão AE ou água, antes da centrifugação, aumenta geralmente o rendimento de ADN.

Um terceiro passo de eluição com mais 200µL de Tampão AE aumentará os rendimentos em até 15%. Os volumes de mais de 200µL não devem ser eluídos num tubo de microcentrífuga de 1,5ml porque a coluna de spin entrará em contacto com o eluído, levando a uma possível formação de aerossol durante a centrifugação.

A eluição com volumes inferiores a 200µL aumenta a concentração final de DNA no eluído significativamente, mas reduz ligeiramente a produção total de. A eluição com 4x 100µL em vez de 2 x 200µL não aumenta a eficiência de eluição.

Para armazenamento de DNA a longo prazo, é recomendada a eluição em Tampão AE e colocação a -20°C, uma vez que o DNA armazenado em água está sujeito a hidrólise ácida.

Os rendimentos de DNA dependerão tanto da quantidade como do tipo de tecido processado.



**Protocolo de lise das bactérias de Gram Negativo**

1. Colocar um banho de água ou um bloco de calor a 55°C.
2. Colher até  $2 \times 10^9$  Gram negativos (~ 1mL de cultura E. coli durante a noite) por centrifugação. Se estiver usar um grânulo de células congeladas, vá para a Etapa 3.
3. Ressuspender o sedimento celular em 180µL de tampão de digestão Genomic PureLink®. Adicionar 20µL de Proteinase K para lisar as células. Misture bem com um breve vórtice.
4. Incubar o tubo a 55°C com vortex ocasional até que a lise esteja completa (30 minutos até 4 horas).
5. Adicionar 20µL de RNase A ao lisado, misture bem por meio de vortex breve e incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos.
6. Adicionar 200µL PureLink® Genomic Lysis / Binding Buffer e misture bem por vortex para obter uma solução homogênea.
7. Adicionar 200µL de etanol (96-100%) ao lisado. Misture bem por vortex durante 5 segundos ou até produzir uma solução homogênea. Nota: ao processar múltiplas amostras, você pode preparar uma mistura principal de tampão / etanol misturando 200µL de Lysis / Binding Buffer e 200µL de etanol 96-100% para cada amostra.

**Protocolo de lise das bactérias de Gram positivo**

1. Coloque dois banhos de água ou blocos de calor a 37°C e 55 ° C, respectivamente.
2. Prepare o tampão de digestão com lisozima. Para ~ 200µL de tampão / amostra de digestão com lisozima, adicione lisozima fresca para obter uma concentração final de lisozima de 20 mg/mL.
3. Colher até  $2 \times 10^9$  grampo células positivas por centrifugação. Se você estiver usando um grânulo de células congeladas, vá para a Etapa 4.
4. Ressuspender o sedimento celular em 180µL de tampão de digestão com lisozima contendo a lisozima do Passo 2. Misture bem por meio de um vórtice breve.

5. Incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Adicionar 20µL de Proteinase K. Misture bem com um breve vórtice.
7. Adicionar 200µL de tampão de lise genômica PureLink® e misture bem com um breve vortex.
8. Incubar a 55 ° C durante 30 minutos.
9. Adicionar 200µL 96-100% de etanol ao lisado. Misture bem por vortex durante 5 segundos ou até produzir uma solução homogênea.
10. Prepara uma coluna de rotação PureLink® em um tubo de coleção da embalagem.
11. Adicionar o lisado (~ 640µL) preparado com PureLink® Genomic Lysis / Binding tampão e etanol para a coluna de rotação PureLink®.
12. Centrifugar a coluna a 10 000g durante 1 minuto à temperatura ambiente.
13. Descartar o tubo de recolha e coloque a coluna de rotação num PureLink® limpo tubo de recolha fornecido com o kit.
14. Adicionar 500µL de tampão de lavagem 1 na coluna.
15. Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 10 000g durante 1 minuto.
16. Descartar o tubo de recolha e colocar a coluna de rotação num tubo limpo.
17. Adicionar 500µL de tampão de lavagem 2 na coluna.
18. Centrifugar a coluna a velocidade máxima por 3 minutos a temperatura ambiente. Descarte o tubo de recolha.
19. Colocar a coluna de rotação em um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5mL.
20. Adicionar 25-200µL de PureLink® Genomic Elution Buffer à coluna
21. Incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugue a coluna em velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente. O tubo contém DNA genómico purificado.

**22.** Para recuperar mais DNA, execute um segundo passo de eluição usando a mesma eluição.

**23.** Centrifugue a coluna à velocidade máxima durante 1,5 minutos à temperatura ambiente. O tubo contém DNA purificado. Remova e descarte a coluna.

**24.** Armazene o DNA purificado a -20°C

### **Protocolo: Isolamento de ADN de fezes para detecção de patógenos**

#### **Pontos importantes antes de iniciar:**

Para a detecção de células difíceis de lisar, como as de algumas bactérias e parasitas, a temperatura de lise no passo 3 pode ser aumentada para 95°C, se necessário.

Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas à temperatura ambiente (15-25°C) a 20.000g (aproximadamente 14.000 rpm). Aumentar o tempo de centrifugação proporcionalmente se a sua centrífuga não puder fornecer 20 000g (por exemplo, em vez de centrifugar durante 5 min a 20 000g, centrifugar durante 10 min a 10 000g).

**1.** Pesar 180-220 mg de fezes num tubo de microcentrífuga de 2 ml (não fornecido) e colocar o tubo sobre gelo.

Este protocolo é otimizado para uso com 180-220 mg de fezes, mas também pode ser usado com quantidades menores. Não é necessário reduzir as quantidades de tampões ou matriz InhibitEX quando se utilizam quantidades menores de fezes. Para amostras > 220mg, ver "Protocolo:

Se a amostra é líquida, pipetar 200µL no tubo de microcentrífuga. Corte a extremidade da ponta da pipeta para facilitar a pipetagem.

Se a amostra estiver congelada, use um bisturi ou espátula para raspar pedaços de fezes em 2 ml em um tubo de microcentrífuga em gelo.

**Nota:** Ao utilizar amostras de fezes congeladas, tome cuidado para que as amostras não descongelem até que o tampão ASL seja adicionado no passo 2 para lisar a amostra;

Caso contrário, o DNA da amostra pode degradar. Após a adição de Buffer ASL, todas as etapas a seguir podem ser realizadas à temperatura ambiente (15-25°C).

**2.** Adicionar 1,4mL de Tampão ASL a cada amostra de fezes. Vortex continuamente durante 1 minuto ou até a amostra de fezes ficar completamente homogeneizada.

**Nota:** É importante agitar as amostras cuidadosamente. Isto ajuda a assegurar a máxima concentração de DNA no eluato final.

**3.** Aquecer a suspensão durante 5 min a 70°C.

Este passo de aquecimento aumenta a produção total de DNA de 3 a 5 vezes e ajuda a lisar bactérias e outros parasitas. A temperatura de lise pode ser aumentada para 95°C para células que são difíceis de lisar (tais como bactérias Gram-positivas).

**4.** Vortex durante 15 s e centrifugar a amostra a velocidade máxima durante 1 min para sedimentar as partículas de fezes.

**5.** Pipetar 1,2mL do sobrenadante num novo tubo de microcentrífuga de 2mL (não fornecido) e descartar o pellet.

**6.** Adicionar 1 Comprimido InhibitEX a cada amostra e agitar vortex imediatamente e continuamente durante 1 minuto ou até o comprimido estar completamente suspenso. Incubar a suspensão durante 1 min à temperatura ambiente para permitir que os inibidores se adsorvam à matriz InhibitEX.

**7.** Centrifugar a amostra à velocidade máxima durante 3 minutos para inibir os sedimentos ligados à matriz InhibitEX.

**8.** Pipetar todo o sobrenadante num novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL (não fornecido) e deitar fora o pellet. Centrifugar a amostra à velocidade máxima durante 3 min.

**9.** Pipetar 15µL de proteinase K num novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL (não fornecido).

**10.** Pipetar 200µL de sobrenadante do passo 8 para o tubo de microcentrífuga de 1,5mL contendo proteinase K.

**11.** Adicionar 200µL de tampão AL e agitar em vórtex durante 15 s.

**Nota:** Não adicione proteinase K diretamente ao tampão AL.

**12.** Incubar a 70°C durante 10 min. Centrifugar brevemente para remover gotas do interior da tampa do tubo (opcional).

**13.** Adicionar 200mL de etanol (96-100%) ao lisado, e misturar por vórtex.

**14.** Rotule a tampa de uma nova coluna de centrifugação QIAamp colocada num tubo de recolha de 2mL. Aplicar cuidadosamente o lisado completo do passo 13 para a coluna de rotação QIAamp sem humedecer a borda. Fechar a tampa e centrifugue à velocidade máxima por 1 min.

Colocar a coluna de centrifugação QIAamp num novo tubo de recolha de 2mL e descartar o tubo que contém o filtrado.

Fechar cada coluna de rotação para evitar a formação de aerossóis durante a centrifugação.

Se o lisado não tiver passado completamente a coluna após a centrifugação, centrifugar novamente até que a coluna de rotação QIAamp esteja vazia.

**15.** Abrir cuidadosamente a coluna de rotação QIAamp e adicionar 500µL de tampão AW1. Fechar a tampa e centrifugue à velocidade máxima por 1 min. Colocar a coluna de centrifugação QIAamp num novo tubo de recolha de 2mL e deitar fora o tubo de recolha que contém o filtrado.

**16.** Abrir cuidadosamente a coluna de rotação QIAamp e adicione 500µL de tampão AW2. Feche a tampa e centrifugue à velocidade máxima por 3 min. Descartar o tubo de coleta contendo o filtrado.

**Nota:** O tampão residual AW2 no eluato pode causar problemas em aplicações a jusante. Alguns rotores de centrífuga podem vibrar após desaceleração, resultando no fluxo, que contém Buffer AW2, contactando a coluna de rotação QIAamp. A remoção da coluna de rotação QIAamp e do tubo de coleta do rotor também pode fazer com que o fluxo entre em contato com a coluna de rotação QIAamp.

**17.** Recomendado: Colocar a coluna de centrifugação QIAamp num novo tubo de recolha de 2 mL (não fornecido) e descartar o tubo de recolha antigo com o filtrado.

Centrifugar à velocidade máxima por 1 min. Esta etapa ajuda a eliminar a possibilidade de possível transferência de Buffer AW2.

**18.** Transferir a coluna de centrifugação QIAamp para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL, marcado (não fornecido). Abrir com cuidado a coluna de rotação QIAamp e pipetar 200µL de tampão AE diretamente na membrana QIAamp. Fechar a tampa e incubar durante 1 min à temperatura ambiente, em seguida centrifugar a velocidade máxima durante 1 min para eluir DNA. Para armazenamento a longo prazo, recomendamos manter o eluato a -20°C

### Anexo 3. Resultados de sequenciação

Amostra	Tamanho	Sequência	Query cover	Similaridade	E-value	ID GenBank	Descrição
10	132	CGGGAGCGCC	93.00%	98.00%	3*10 <sup>-51</sup>	<a href="#">AP018050.1</a>	<a href="#">Prevotella melaninogenica</a> DNA, complete genome, strain: GAI 07411
		TAAGGGATGT	93.00%	98.00%	3*10 <sup>-52</sup>	<a href="#">AP018049.1</a>	<a href="#">Prevotella melaninogenica</a> DNA, complete genome, strain: GAI 07411
		AAACTGCTTTT	93.00%	98.00%	3*10 <sup>-53</sup>	<a href="#">CP022041.1</a>	<a href="#">Prevotella melaninogenica</a> strain FDAARGOS_306 chromosome 2, complete sequence
		GTATGGGGAT	93.00%	98.00%	3*10 <sup>-54</sup>	<a href="#">CP022040.1</a>	<a href="#">Prevotella melaninogenica</a> strain FDAARGOS_306 chromosome 1, complete sequence
		AAAGTTTGGG	93.00%	98.00%	3*10 <sup>-55</sup>	<a href="#">LT677937.1</a>	<a href="#">Prevotella melaninogenica</a> partial 16S rRNA gene, isolate 219N_3351
		CCGGTACAGCT	91.00%	95.00%	9*10 <sup>-47</sup>	<a href="#">CP013195.1</a>	<a href="#">Prevotella enoeca</a> strain F0113, complete genome
15	138	CTAGGGTTGTA	91.00%	95.00%	9*10 <sup>-47</sup>	<a href="#">KT274175.1</a>	<a href="#">Prevotella enoeca</a> strain 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
		ACTGCTTTTAT	91.00%	95.00%	9*10 <sup>-47</sup>	<a href="#">NR_113104.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10800
		GCGGGGATAA	91.00%	95.00%	9*10 <sup>-47</sup>	<a href="#">NR_025281.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10791
		AGAGAGGGAC	91.00%	92.00%	9*10 <sup>-42</sup>	<a href="#">HM587317.1</a>	<a href="#">Prevotella</a> sp. 8404125 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
59	138	CCGTAGCGCA	85.00%	94.00%	4*10 <sup>-45</sup>	<a href="#">LT698212.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate W066N_23630
		CTTGGGTTGTA	85.00%	94.00%	4*10 <sup>-45</sup>	<a href="#">LT697296.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 10T_22714
		AACTGCTTTTA	85.00%	94.00%	4*10 <sup>-45</sup>	<a href="#">LT685385.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10800
		TTCGGAATA	85.00%	94.00%	4*10 <sup>-45</sup>	<a href="#">LT685376.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10791
		AAGACAGGGA	85.00%	94.00%	4*10 <sup>-45</sup>	<a href="#">FJ976299.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. clone 10B127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
		TGTACGCCTAG	84.00%	96.00%	1*10 <sup>-50</sup>	<a href="#">LT698212.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate W066N_23630
65	144	GGTTGTAAGT	84.00%	96.00%	1*10 <sup>-50</sup>	<a href="#">LT697296.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 10T_22714
		CTTTTATGCGG	84.00%	96.00%	1*10 <sup>-50</sup>	<a href="#">LT685385.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10800
		GGATAAGCG	84.00%	96.00%	1*10 <sup>-50</sup>	<a href="#">LT685376.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10791
		AGGGACGTGT	84.00%	96.00%	1*10 <sup>-50</sup>	<a href="#">GU409637.1</a>	<a href="#">Prevotella oris</a> clone WWC_C3ALM025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
70	135	CGGTGCGCACT	91.00%	98.00%	9*10 <sup>-57</sup>	<a href="#">LT694968.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 472N_20386
		CCGGTTGTAAA	91.00%	98.00%	9*10 <sup>-57</sup>	<a href="#">LT689793.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 459N_15209
		CTGCTTTTAGT	91.00%	98.00%	9*10 <sup>-57</sup>	<a href="#">LT689818.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate 459N_15234
		TGGGAATAAA	91.00%	98.00%	9*10 <sup>-57</sup>	<a href="#">LT681548.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate U6T_6962
		AAAAGGGACG	91.00%	98.00%	9*10 <sup>-57</sup>	<a href="#">LT681513.1</a>	Uncultured <a href="#">Prevotella</a> sp. partial 16S rRNA gene, isolate U6T_6927

90	129	CCGTTGCGCAC	93.00%	94.00%	1*10-45	<a href="#">KP334248.1</a>	<a href="#">Prevotella dentasini strain AN 4713 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		TAGGGTTGTAA	93.00%	94.00%	1*10-45	<a href="#">NR_113102.1</a>	<a href="#">Prevotella dentasini strain JCM 15908 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		CTGCTTTTATG	93.00%	94.00%	1*10-45	<a href="#">NR_112848.1</a>	<a href="#">Prevotella dentasini strain NUM 1903 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		CGGGGAAAAG	93.00%	93.00%	6*10-45	<a href="#">KP108995.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 889 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		TGCGCCCGCGT	93.00%	93.00%	6*10-45	<a href="#">KP107913.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 695 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
111	133	TGCAGCGGCA	95.00%	98.00%	2*10-58	<a href="#">KP103738.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 15515 16S ribosomal RNA gene</a>
		CCTAGGGTTGT	94.00%	98.00%	7*10-58	<a href="#">LT707623.1</a>	<a href="#">Prevotella denticola partial 16S rRNA gene, strain HAC17, isolate #17</a>
		AAACTGCTTTT	94.00%	98.00%	7*10-58	<a href="#">LT692953.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 181T_18370</a>
		ATGCGGGGAT	94.00%	98.00%	7*10-58	<a href="#">LT692567.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 408T_17984</a>
		AAAGTGAGGG	94.00%	98.00%	7*10-58	<a href="#">LT692927.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 181T_18344</a>
117	134	AGTACGCACT	91.00%	98.00%	3*10-56	<a href="#">GQ332252.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone V15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		AGGGTTGTAA	91.00%	96.00%	3*10-51	<a href="#">LT007806.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, OTU00945</a>
		ACTGCTTTTAT	91.00%	95.00%	2*10-49	<a href="#">KY664736.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone denovo236121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		GCGGGGATAA	91.00%	95.00%	2*10-49	<a href="#">KP102216.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 1125 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		AACGCGGGAC	91.00%	94.00%	7*10-48	<a href="#">KY670531.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone denovo97185 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
124	131	CCGTAGCACA	91.00%	98.00%	4*10-55	<a href="#">LT698212.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate W066N_23630</a>
		CTAGGGTTGTA	91.00%	98.00%	4*10-55	<a href="#">LT697296.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 10T_22714</a>
		AACTGCTTTTA	91.00%	98.00%	4*10-55	<a href="#">LT685385.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10800</a>
		TGCGGGGATA	91.00%	98.00%	4*10-55	<a href="#">LT685376.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10791</a>
		AAGTGAGGGA	91.00%	98.00%	4*10-55	<a href="#">FJ976299.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 10B127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
137	129	CCGTGTGCCTA	94.00%	95.00%	2*10-50	<a href="#">LT698212.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate W066N_23630</a>
		GGGTTGTA ACT	94.00%	95.00%	2*10-50	<a href="#">LT697296.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 10T_22714</a>
		GCTTTTTGCGG	94.00%	95.00%	2*10-50	<a href="#">LT685385.1</a>	<a href="#">Select seq LT685385.1 Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10800</a>
		GGAAAAGTGA	94.00%	95.00%	2*10-50	<a href="#">LT685376.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10791</a>
		GGGACGTGTC	94.00%	95.00%	2*10-50	<a href="#">FJ976299.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 10B127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
140	80	CGTGTCCTTCA	98.00%	100.00%	4*10-35	<a href="#">LT698212.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate W066N_23630</a>
		TTGCAGGTACC	98.00%	100.00%	4*10-35	<a href="#">LT697296.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 10T_22714</a>
		GCATGAATAA	98.00%	100.00%	4*10-35	<a href="#">LT685385.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10800</a>
		GGACCGGCTA	98.00%	100.00%	4*10-35	<a href="#">LT685376.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10791</a>
		ATTCCGTGCCA	98.00%	100.00%	4*10-35	<a href="#">FJ976299.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 10B127 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>



147	130	CCAAGCTCACT	92.00%	95.00%	2*10 <sup>-48</sup>	<a href="#">LT698212.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate W066N_23630</a>
		AGGGTTGTAA	92.00%	95.00%	2*10 <sup>-48</sup>	<a href="#">LT697296.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 10T_22714</a>
		CTGCTTTTTGC	92.00%	95.00%	2*10 <sup>-48</sup>	<a href="#">LT685385.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10800</a>
		GGGGATAAAG	92.00%	95.00%	2*10 <sup>-48</sup>	<a href="#">LT685376.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 89N_10791</a>
		TGAGGGACGT	92.00%	95.00%	2*10 <sup>-48</sup>	<a href="#">FJ976299.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 10B127 16S ribosomal RNA gene, partial sequen</a>
149	126	AGTAGCCTTGG	94.00%	98.00%	7*10 <sup>-53</sup>	<a href="#">KF007172.1</a>	<a href="#">Prevotella sp. S9 HS-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		GTTGTAACCTGC	94.00%	98.00%	7*10 <sup>-53</sup>	<a href="#">JN867261.1</a>	<a href="#">Prevotella buccalis strain SEQ186 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		TTTTTGCGGGG	94.00%	98.00%	7*10 <sup>-53</sup>	<a href="#">NR_113098.1</a>	<a href="#">Prevotella buccalis strain JCM 12246 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		ATAAAGTGCG	94.00%	97.00%	9*10 <sup>-52</sup>	<a href="#">JN867226.1</a>	<a href="#">Prevotella buccalis strain SEQ057 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		CGACGTGTCGT	94.00%	96.00%	1*10 <sup>-50</sup>	<a href="#">JN867243.1</a>	<a href="#">Prevotella buccalis strain SEQ077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
153	128	CCGTATGCCTA	92.00%	93.00%	7*10 <sup>-43</sup>	<a href="#">LT008079.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, OTU01218</a>
		GGGTTGTAACT	92.00%	93.00%	7*10 <sup>-43</sup>	<a href="#">KP103344.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. clone 14395 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc</a>
		GCTTTTTGCGG	92.00%	93.00%	7*10 <sup>-43</sup>	<a href="#">KF007172.1</a>	<a href="#">Prevotella sp. S9 HS-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		GGAAAAGGGC	92.00%	93.00%	7*10 <sup>-43</sup>	<a href="#">JN867261.1</a>	<a href="#">Prevotella buccalis strain SEQ186 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
		GCGACGTGTG	92.00%	93.00%	7*10 <sup>-43</sup>	<a href="#">JN867226.1</a>	<a href="#">Prevotella buccalis strain SEQ057 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>
169	127	CAGTAGCCTA	93.00%	97.00%	3*10 <sup>-51</sup>	<a href="#">LT698550.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 493T_23968</a>
		GGGTTGTAACT	93.00%	97.00%	3*10 <sup>-51</sup>	<a href="#">LT698547.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 493T_23965</a>
		GCTTTTTGTGG	93.00%	97.00%	3*10 <sup>-51</sup>	<a href="#">LT698543.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 493T_23961</a>
		GGATAAAGTG	93.00%	97.00%	3*10 <sup>-51</sup>	<a href="#">LT698541.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 493T_23959</a>
		CGTGACGTGTC	93.00%	97.00%	3*10 <sup>-51</sup>	<a href="#">LT698538.1</a>	<a href="#">Uncultured Prevotella sp. partial 16S rRNA gene, isolate 493T_23956</a>

## Anexo 4. Base de dados

ID	Tipo da amostra	Exame cultural anaerobiose	Antibioterapia	Consistência de amostra	PCR Bacteroides	PCR Prevotella	PCR clostridium
1	Mediatino	Negativo	Meropenem; Vancomicina	Líquida/Viscosa	Negativo	negativo	Negativos
2	Liq Pleural	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	
3	Abcesso perianal	Bac fragilis; Fusobacterium nucleatum; Prevotella intermedia	Não	Purulenta	Negativo	Negativo	NA
4	Abcesso peri amigdalino	Prevotella melaninogenica	Penicilina	NA			
5	Ferida operatória	Negativo	Ciprofloxacina; Fluconazol	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
6	L ascítico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	NA
7	L ascítico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	NA
8	Exs ferida cirurgica	Negativo	Não	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
9	L ascítico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	Negativo	NA
10	Exs purulento profundo	Bac thetaiotaomicron; Clostridium perfringens	Gentamicina; clindamicina	Purulenta	19.05; 18.26	24.53; 24.66	32.39; 32.74
11	Exs purulento profundo	Negativo	Pip/tazobactam; Metronidazol	Líquida/Viscosa	35.28; 36.13	Negativo	Negativos
12	L pleural	Negativo	Pip/tazobactam; Clarithromicina	Líquida	Negativo	Negativo	NA
13	Abcesso cervical	Prevotella bucae; Prevotella intermedia	Ceftriaxone; Clindamicina	NA			
14	L ascítico	Clostridium perfringens	Desconhecido	Líquida	Negativo	negativo	Negativos
15	Exs purulento profundo	Negativo	Ceftriaxone	Purulenta	34.03; 32.82	33.40; 33.20	Negativos
16	L ascítico	Negativo	Meropenem	Líquida	Negativo	negativo	NA
17	L ascítico	Negativo	Não	Líquida/Viscosa	36.98; 37.95	negativo	Negativos
18	L articular	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	NA
19	L pleural	Negativo	Pip/tazobactam; Clindamicina	Líquida/Viscosa	Negativo	negativo	Negativos
20	Exs purulento profundo Intra abdominal peri apendicular	Negativo	Não	NA			

21	L ascítico	Negativo	Pip/tazobactam	Líquida/Viscosa	38.83; 36.33	negativo	Negativos
22	Ferida operatória	Negativo	Vancomicina; Metronidazol	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
23	Bilis	Negativo	Meropenem	Líquida	Negativo	negativo	NA
24	L ascítico	Negativo	Não	Líquida/Viscosa	Negativo	negativo	NA
25	Exs purulento profundo	Bacteroides urealyticus; Prevotella intermedia	Amox/ac clav; Metronidazol	Purulenta	Negativo	35.37; 31.22	Negativos
26	Exs purulento profundo	Negativo	Clindamicina; Meropenem; Vancomicina	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
27	L ascítico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	
28	Bilis	Negativo	Não	NA			
29	Liq Peri renal	Negativo	Desconhecido	Líquida/Viscosa	Negativo	negativo	Negativos
30	L ascítico	Bacteroides thetaiotaomicon Eggerthella lenta	Pip/tazobactam	Líquida/Viscosa	27.73; 27.05	34.47; 35.46	Negativos
31	Exs purulento profundo	Veillonella spp	Desconhecido	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
32	Exs purulento profundo	Negativo	Gentamicina	Purulenta	39.28; 37.13	36.85; 38.99	Negativos
33	Abcesso peri amigdalino	Negativo	Não	Purulenta	Negativo	negativo	NA
34	Outros	Negativo	Desconhecido	NA			
35	Ferida operatória	Bacteroides uniformis	Clindamicina; Gentamicina	Purulenta	41.51; 38.79	Negativo	Negativos
36	L ascítico	Negativo	Pip/tazobactam	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	Negativos
37	Ferida operatória	Bacteroides thetaiotaomicon Prevotella disiens	Clindamicina; Gentamicina; Meropenem	Purulenta	26.35; 26.71	Negativo	Negativos
38	L ascítico	Bacteroides ovatus; Clostridium innocuum	Pip/tazobactam	Líquida/Viscosa	31.15; 31.61	Negativo	Negativos
39	Exs purulento profundo	Negativo	Desconhecido	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
40	Bilis	Negativo	Não	NA			
41	Exs purulento profundo	Negativo	Pip/tazobactam	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
42	Liq sinovial	Negativo	Não	Líquida/Viscosa	Negativo	negativo	NA
43	Liq sinovial	Negativo	Ceftriaxone; Vancomicina	Líquida	Negativo	negativo	NA
44	Igual ao 43			Líquida	Negativo	negativo	NA
45	Igual ao 43			Líquida	Negativo	negativo	NA
46	L ascítico	Negativo	Pip/tazobactam	Líquida/Viscosa	Negativo	negativo	Negativos
47	Exs purulento profundo Intra abdominal	Negativo	Amox/ac clav;	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
48	Exs purulento profundo Intra abdominal	Negativo	Pip/tazobactam	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	Negativos
49	Exs purulento profundo	Negativo	Desconhecido	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
50	L ascítico	Bacteroides fragilis; Anaerococcus previtii; Prevotella intermedia	Meropenem; metronidazol	Líquida/Viscosa	26.44; 21.48	21.34; 22.42	Negativos

51	L ascítico	Negativo	Meropenem; metronidazol	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	Negativos
52	Dedo pé	Negativo	Desconhecido	NA			
53	Exs purulento profundo	Bacteroides thetaiotaomicron; Parvimonas micra; BGN Pigmentado não identificado	Meropenem; metronidazol	Purulenta	32.65;33.62	Negativo	Negativos
54	L pleural	Negativo	Não	Líquida	Negativo	Negativo	NA
55	L ascítico	Bacteroides ovatus; Clostridium perfringens Bacteroides fragilis	Clindamicina; Gentamicina	Líquida/Viscosa	19.59; 19.25	Negativo	38.30; 34.70
56	L ascítico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	NA
57	Liq sinovial	Negativo	Vancomicina	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	NA
58	Liq sinovial = ant	Negativo	Vancomicina	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	Negativos
59	L ascítico	Negativo	Não	Líquida/Viscosa	Negativo	34.07; 31.81	Negativos
60	Ferida operatória	Negativo	Pip/tazobactam	Purulenta	Negativo	negativo	Negativos
61	L pleural	Negativo	Meropenem; Pip/tazobactam; Vancomicina; anfotericina B	Líquida	Negativo	negativo	NA
62	Liq sinovial Anca direita	Negativo	Vancomicina	Líquida	Negativo	negativo	NA
63	Liq sinovial	Negativo	Amox/ac clavulânico	Líquida	Negativo	Negativo	NA
64	Bilis	Negativo	Cefazolina	Líquida	Negativo	Negativo	NA
65	Liq sinovial	Negativo	Não	Líquida/Viscosa	Negativo	34.61; 34.14	Negativos
66	Exs purulento profundo - seio maxilar	Prevotella disiens	Ceftriaxone; Clindamicina	Purulenta	Negativo	26.21; 26.00	Negativos
67	Bilis	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	NA
68	L pericardico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	NA
69	Exs purulento profundo	Negativo	Cefoxitina	Purulenta	33.13; 33.06	Negativo	Negativos
70	Exs purulento profundo	Negativo	Desconhecido	Purulenta	Negativo	26.70; 25.85	Negativos
71	Exs purulento profundo Intra- peritoneal	Bacteroides thetaiotaomicron	Não	Purulenta	31.07; 31.32	Negativo	Negativos
72	Exs purulento profundo	Parvimonas micra; Bacteroides ovatus; Prevotella disiens,	Meropenem; metronidazol	Purulenta	22.26; 22.12	25.16; 25.29	Negativos
73	Liq sinovial	Negativo	Desconhecido	Líquida	Negativo	negativo	NA
74	Exs purulento profundo	Negativo	Pip/tazobactam	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
75	Exs purulento profundo	Negativo	Ciprofloxacina	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
76	Exs purulento profundo	Bacteroides fragilis	Não	NA			
77	Bilis	Negativo	Pip/tazobactam	Líquida	37.56; 38.69	negativo	Negativos
78 - 1	Liq articular	Negativo	Gentamicina; vancomicina	Líquida	Negativo	negativo	NA
78-2	Liq articular = ant			Líquida	Negativo	Negativo	Negativos
79	Biópsia	Negativo	Desconhecido	Purulenta	negativo	negativo	NA
80-1	Exs purulento profundo	Negativo	Cefoxitina	Líquida	Negativo	negativo	NA
80-2	L ascítico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	Negativo	NA
81	Exs purulento profundo	Negativo	Não	Purulenta	Negativo	Negativo	NA

82	L ascítico	Negativo	Meropenem	Líquida	Negativo	negativo	NA
83	Exs purulento profundo	Porphyromonas gingivalis	Amox/ac clavulânico	NA			
84	Exs purulento profundo (Exs vaginal)	Bacteroides fragilis; Prevotella intermedia; Prevotella disiens	Não	NA			
85	Ferida operatória	Negativo	Ciprofloxacina	Purulenta	negativo	negativo	NA
86	Exs purulento profundo	Negativo	Não	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	Negativos
87	L pleural	Negativo	Ceftazidima; Gentamicina; Vancomicina	Líquida	Negativo	Negativo	NA
88	Exs purulento profundo	Negativo	Pip/tazobactam; Metronidazol	Purulenta	Negativo	Negativo	NA
89	Ferida operatória	Negativo	Meropenem; Vancomicina	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
90	Exs purulento profundo	Negativo	Não	Purulenta	Negativo	36,50; 36.63	Negativos
91	Liq sinovial	Negativo	Não	NA			
92	L ascítico	Negativo	Meropenem; Vancomicina	Líquida	Negativo	negativo	NA
93	Bilis	Negativo	Cefazolina	Líquida	Negativo	negativo	NA
94	Exs purulento profundo L ascítico	Negativo	Não	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
95	L ascítico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	negativo	NA
96	L pleural	Negativo	Pip/tazobactam; Vancomicina; Fluconazol	Líquida	Negativo	negativo	NA
97	Exs purulento profundo	Negativo	Pip/tazobactam; Vancomicina; Fluconazol	Purulenta	Negativo	negativo	Negativos
98	Exs purulento profundo	Prevotella bucae; Prevotella disiens	Clindamicina	Purulenta	Negativo	36.55; 37.28	Negativos
99	L ascítico	Bacteroides thetaiotaomicron	Clindamicina; gentamicina	Líquida/Viscosa	28.66; 28.51	Negativo	Negativos
100	Exs purulento profundo Joelho	Negativo	Amox/ac clavulânico; Fluconazol	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
101	L ascítico	Negativo	Meropenem, Vancomicina	Líquida/Viscosa	35.77; 36.86	Negativo	Negativos
102	L ascítico	Negativo	Amox/ac clavulânico	Líquida	Negativo	negativo	NA
103	Exs purulento profundo	Negativo	Não	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	NA
104	Bilis	Negativo	Não	NA			
105	Bilis	Negativo	Pip/tazobactam	Líquida	Negativo	negativo	NA
106	Exs purulento profundo	Negativo	Meropenem; gentamicina	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
107	Exs purulento profundo	Bacteroides stercoris; Fusobacterium mortiferum; Prevotella disiens	Não	Purulenta/Líquida	25.11; 26.45	38.05; 39.18	NA
108	Exs purulento profundo	Negativo	Ceftriaxone; Metronidazol	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
109	Exs purulento profundo	Negativo	Não	Purulenta	33.75;34.03	Negativo	Negativos
110	Exs ferida cirurgica	Negativo	Amox/ ac clavu	Purulenta	Negativo	Negativo	NA

111	L ascítico	Bacteroides thetaiotaomicron	Pip/tazobactam	Líquida/Viscosa	25.51; 25.31	25.79; 25.30	NA
112	Exs purulento profundo Intra articular joelho	Negativo	Flucloxacilina	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
113	Exs purulento profundo	Bacteroides stercoris; Anerococcus prevotii Prevotella disiens	Amox+Ac clavulanico Metronidazol	Purulenta	27.04; 25.39	34.06; 33.45	Negativos
114	Ferida operatória	Negativo	Não	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
115	L pleural	Negativo	Levofloxacina	Líquida	Negativo	negativo	NA
116	Bilis	Negativo	Cefazolina	Líquida	Negativo	negativo	NA
117	L ascítico	Negativo	Pip + tazobactam	Líquida/Viscosa	27.96; 24.13	32.05	Negativos
118- 1	Exs purulento profundo	Negativo	Pip + tazobactam e Vancomicina	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
118- 2				Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
119	L ascítico	Negativo	Pip + tazobactam e Gentamicina	Líquida/Viscosa	37.43; 35.85	Negativo	Negativos
120	Exs purulento profundo Intra-abdominal	Prevotella buccae; Clostridium clostridioforme Prevotella melaninogenica	Não	Purulenta	37.29; 37.94	Negativo	Negativos
121	L pericardico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	Negativo	NA
122	L ascítico	Negativo	Desconhecido	Líquida	Negativo	Negativo	NA
123	Exs purulento profundo	Negativo	Pip + tazobactam	Purulenta	Negativo	Negativo	NA
124	Exs purulento profundo Intra - abdominal	Negativo	Pip + tazobactam e Vancomicina	Purulenta	37.45; 37.33	37.70; 38.14	Negativos
125	Ferida operatória	Negativo	Meropenem	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
126	L ascítico	Negativo	Meropenem	Líquida/Viscosa	Negativo	34.42; 33.87	NA
127	Ferida operatória	Bacteroides caccae Bacilo Gram negativo não identif	Clindamicina; Gentamicina	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
128	Ferida operatória	Bacteroides thetaiotaomicron	Não	Purulenta	29.82; 29.59	Negativo	Negativos
129	Exs purulento profundo	Prevotella oralis Anaerococcus prevotii	Não	NA			
130	L ascítico	Bacteroides thetaiotaomicron Bacteroides ovatus Anaerococcus prevotii	0	Líquida/Viscosa	26.65;26.44	Negativo	NA
131	Exs purulento profundo	Negativo	Não	Purulenta/Líquida	Negativo	Negativo	NA
132	Exs purulento profundo	Negativo	Meropenem; Vancomicina	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
133	Exs purulento profundo	Negativo	Gentamicina; Meropenem Vancomicina	NA			
134	Bilis	Negativo	Cefazolina	Líquida	Negativo	Negativo	NA
135	L ascítico	Bacteroides thetaiotaomicron	Pip+tazobactam; Gentamicina Clindamicina	Líquida	21.93;21.46	38.66; 39.39	NA
136	Ferida operatória	Negativo	Pip+tazobactam	NA			
137	L ascítico	Negativo	Pip+tazobactam	Líquida/Viscosa	Negativo	36.61; 35.97	NA
138	Bilis	Negativo	Amox/ac clavulanico	Líquida	Negativo	Negativo	NA
139	Bilis	Negativo	Não	Líquida	Negativo	Negativo	NA
140	Exs purulento profundo	Bacilo Gram negativo pigmentado não identif	Não	Purulenta	Negativo	16.30; 16.28	Negativos

141	L ascítico	Negativo	Desconhecido	Líquida	Negativo	Negativo	NA
142	Ferida operatória	Negativo	Não	Purulenta/Líquida	Negativo	Negativo	NA
143	Bilis	Negativo	Gentamicina; vancomicina	Líquida	Negativo	Negativo	NA
144	Liq pericardico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	Negativo	NA
145	L ascítico	Negativo	Piperacilina/tazobactam	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	Negativos
146	Outros	Negativo	Desconhecido	Purulenta	Negativo	Negativo	Negativos
147	Exs purulento profundo	Negativo	Ciprofloxacina	Purulenta	Negativo	35.51; 35.38	NA
148	Bilis	Negativo	Cefazolina	Líquida/Viscosa	negativo	Negativo	Negativos
149	Exs purulento profundo	Peptococcus anaerobius Finegoldia magnum	Flucloxacilina	Purulenta	negativo	21.60; 22.21	Negativos
150	Exs purulento profundo	Negativo	Amox/ac clavulanico	Purulenta/Líquida	38.69; 40.72	Negativo	NA
151	L ascítico	Negativo	Meropenem; Vancomicina	Líquida	Negativo	Negativos	NA
152	L ascítico	Clostridium perfringens	Piperacilina/tazobactam	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	38.28; 38.76
153	Exs purulento profundo	Negativo	Piperacilina/tazobactam	Purulenta	34.31; 33.45	36.93; 35.89	Negativos
154	Exs purulento profundo	Bacteroides thetaiotaomicron Bacteroides uniformis	Cefuroxima; Fluconazol	Purulenta/Líquida	Negativo	Negativo	Negativos
155	L ascítico	Negativo	Colistina; Amicacina	Líquida	Negativo	Negativo	NA
156	Bilis	Bacilo Gram positivo não identif	Piperacilina/tazobactam Metronidazol	Líquida	Negativo	Negativo	NA
157	L sinovial	Negativo	Ceftriaxone; Vancomicina	Líquida/Viscosa	Negativo	Negativo	Negativos
158	L ascítico	Prevotella disiens	Piperacilina/tazobactam	Líquida	30.22; 30.27	28.30; 28.96	NA
159	L ascítico	Negativo	Piperacilina/tazobactam	Líquida	Negativo	Negativo	NA
160	Ferida operatória	Negativo	Fluconazol	Purulenta/Líquida	Negativo	Negativo	NA
161	Exs purulento profundo	Negativo	Piperacilina/tazobactam	Purulenta	24.69; 24.94	Negativo	Negativos
162	Exs purulento profundo	Negativo	Meropenem; metronidazol	NA			
163	Exs purulento profundo	Negativo	Não	Purulenta/Líquida	Negativo	Negativo	NA
164	Bilis	Negativo	Não	Líquida	Negativo	Negativos	NA
165	Exs purulento profundo	Veillonella spp Bacteroides fragilis	Piperacilina/tazobactam	Purulenta/Líquida	21.74; 21.93	Negativo	Negativos
166	Exs purulento profundo	Prevotella oralis Fusobacterium nucleatum	Não	Purulenta	Negativo	34.66; 34.09	Negativos
167	L ascítico	Negativo	Piperacilina/tazobactam	Líquida	Negativo	Negativos	NA
168	Bilis	Negativo	Piperacilina/tazobactam	Líquida	Negativo	Negativo	NA
169	Exs purulento profundo	Bacteroides fragilis Parvimonas micra	Não	Purulenta	22.89; 23.11	27.18; 28.49	Negativos
170	L sinovial	Negativo	Flucloxacilina; Rifampicina	Líquida	Negativo	Negativo	NA
171	Liq pericardico	Negativo	Não	Líquida	Negativo	Negativo	NA
172	Ferida operatória	Negativo	Não	NA			